

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Estudio de los mecanismos moleculares
responsables de la adaptación del desarrollo de los
bacteriófagos ϕ 29 y Nf al estado fisiológico de la
célula de *Bacillus subtilis* infectada

Tesis Doctoral

Virginia Castilla Llorente
Madrid, 2008

Índice

- ÍNDICE	1
- ABREVIATURAS	3
- SUMMARY	5
- INTRODUCCIÓN	7
1. La bacteria <i>Bacillus subtilis</i>	7
1.1 Proceso de esporulación	8
1.2 Sistemas de dos componentes y cascadas de fosfatos	10
1.3 La cascada de fosfatos del proceso de iniciación de esporulación	11
1.4 La proteína Spo0A	11
1.5 La esporulación como proceso biestable	13
1.6 División celular durante la esporulación	15
1.7 Inicio de la replicación del cromosoma de <i>B. subtilis</i>	16
1.8 Segregación del cromosoma	18
2. El bacteriófago $\phi 29$	21
2.1 Organización genética y transcripcional	22
2.2 Regulación de la transcripción	24
2.3 Replicación del DNA	26
2.4 Desarrollo del bacteriófago $\phi 29$ a lo largo del crecimiento de <i>B. subtilis</i>	28
- OBJETIVOS	29
- MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. Materiales	31
2. Métodos	37
3. Purificaciones de proteínas	46
- RESULTADOS	49
1. Estudio de los mecanismos moleculares responsables de la estrategia de infección alternativa del bacteriófago $\phi 29$ durante la infección de células que se encuentran en los primeros estadios de la esporulación	49
1.1 Análisis de la secuencia del genoma de $\phi 29$	49
1.2 Papel de las secuencias <i>parS</i> del genoma de $\phi 29$ en la incorporación del genoma del fago en la pre-espora	51
1.3 Papel de la proteína Spo0A de <i>B. subtilis</i> en el desarrollo del ciclo lítico de $\phi 29$ durante la esporulación	53
1.4 Spo0A reprime la replicación del DNA de $\phi 29$	66
1.5 Los sitios de unión de Spo0A del genoma de $\phi 29$ presentan una afinidad relativa alta por Spo0A	71
1.6 Estudios <i>in vivo</i> del efecto de <i>spo0A</i> sobre el desarrollo de $\phi 29$	73

2. Papel de Spo0A sobre el desarrollo del bacteriófago Nf perteneciente al grupo 2 de la familia de fagos de ϕ29	79
2.1 Estudios <i>in vivo</i>	79
2.2 Secuenciación del genoma de Nf y comparación con el de ϕ 29	82
2.3 Los genomas de ϕ 29 y Nf presentan diferencias significativas en cuanto al número de secuencias consenso de unión al DNA de las proteínas Spo0A y Spo0J	89
2.4 Análisis del efecto de Spo0A sobre la transcripción del bacteriófago Nf	90
2.5 Efecto de Spo0A sobre la replicación del bacteriófago Nf	96
3. Papel de Spo0A en el inicio de la replicación del genoma de <i>B. subtilis</i>	101
3.1 La proteína Spo0A se une a varias secuencias localizadas en la región del <i>oriC</i> de <i>B. subtilis</i>	101
3.2 Spo0A previene la apertura de la doble hélice del DNA mediada por la proteína DnaA necesaria para la iniciación de la replicación del DNA de <i>B. subtilis</i>	104
3.3 Spo0A reprime la transcripción del promotor de <i>dnaA</i> localizado en el origen de replicación de <i>B. subtilis</i>	106
- DISCUSIÓN	107
- CONCLUSIONES	123
- BIBLIOGRAFÍA	125

Abreviaturas

aa: aminoácido
A: adenina
ADP: adenosina-5'-difosfato
ATP: adenosina-5'-trifosfato
BSA: seroalbúmina bovina (del inglés, siglas Bovine Serum Albumin)
C: citosina
CH: medio de cultivo con un hidrolizado de caseína (del inglés, siglas Casein Hydrolyzed)
c.p.m.: cuentas por minuto
CTD: dominio carboxilo terminal (del inglés, C-Terminal Domain)
 α CTD: extremo carboxilo terminal de la subunidad α de la RNAP
CTP: citidina-5'-trifosfato
dATP: 2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
DBP: proteína de unión a DNA de banda doble (del inglés, siglas Double stranded DNA Binding Protein)
DNA: ácido desoxirribonucleico (del inglés, siglas DeoxyriboNucleic Acid)
DNAP: DNA polimerasa
DNasa I: desoxirribonucleasa I
dNMP: 2'-desoxirribonucleósidos-5'-monofosfato
dNTPs: 2'-desoxirribonucleósidos-5'-trifosfato
Downstream: regiones de DNA situadas más cerca del extremo 3'
dTMP: 2'-deoxitimidina-5'-monofosfato
DTT: ditioneitol
EDTA: ácido etileno diamino tetraacético
G: guanina
GTP: guanosina-5'-trifosfato
HBSu: proteína nucleica inestable por calor de *B. subtilis* (del inglés, siglas Heat Unstable)
IC: coeficiente de inmunoprecipitación (del inglés, siglas Immunoprecipitation Coefficient)
IPTG: isopropilo- β -D-tiogalactósido
kDa: kilodalton
Km: antibiótico kanamicina
LB: medio de cultivo Luria Bertani
min: minuto
m.o.i.: multiplicidad de infección (del inglés, siglas Multiplicity Of Infection)
mRNA: ácido ribonucleico mensajero (del inglés, siglas Messenger Ribonucleic Acid)
Melting: temperatura a la que se desnaturaliza la cadena doble de DNA
NTP: nucleósido-5'-trifosfato

- OD:** densidad óptica (del inglés, siglas Optical Density)
- ORF:** fase de lectura abierta (del inglés, siglas Open Reading Frame)
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, siglas Polymerase Chain Reaction)
- PEI:** polietilenimina
- pb:** par(es) de bases
- poli[dI-dC]:** polímero de deoxiinosina y deoxicitidina
- RNA:** ácido ribonucleico (del inglés, siglas RiboNucleic Acid)
- RNasin:** inhibidor de RNAsas de tipo A
- RNAP:** RNA polimerasa (del inglés, siglas RiboNucleic Acid Polymerase)
- r.p.m.:** revoluciones por minuto
- rRNA:** ácido ribonucleico ribosómico (del inglés, siglas Ribosomal RiboNucleic Acid)
- PAGE:** electroforesis en geles de poliacrilamida (del inglés, siglas PolyAcrilamide Gel Electrophoresis)
- SDS:** dodecil sulfato sódico (del inglés, siglas Sodium Dodecyl Sulphate)
- SM:** medio de esporulación (del inglés, siglas Sporulation Medium)
- SSB:** proteína de unión a DNA de banda sencilla (del inglés, siglas Single Stranded DNA Binding proteína)
- T:** timina
- Tc:** antibiótico tetraciclina
- TP:** proteína terminal (del inglés, siglas Terminal Protein)
- Tris:** trihidroximetil aminometano
- Upstream:** regiones del DNA situadas más cercanas al extremo 5'
- UTP:** uridina-5'-trifosfato
- wt:** tipo salvaje o silvestre (del inglés, siglas Wild Type)

Summary

Bacillus subtilis cells that are infected during the initial stages of sporulation with the lytic phage $\phi 29$ do not become lysed. Rather, under these conditions, the infected $\phi 29$ genome gets trapped into the spore thereby postponing its lytic life cycle upon germination of the spore. Thus, the $\phi 29$ infection strategy is adapted to the physiological conditions of the host. The molecular mechanisms underlying this alternative infection strategy have been studied in this thesis. The studies showed that the strategy depends on the presence of binding sites on the $\phi 29$ genome for the host-encoded proteins Spo0A (0A boxes) and Spo0J (*parS* sites). Thus, whereas the partition protein Spo0J is involved in spore entrapment of the infecting phage genome, Spo0A, the main transcriptional regulator for entry into sporulation, suppresses the lytic cycle. Interestingly, Spo0A suppresses the phage lytic cycle not only at the level of transcription, but also at the level of DNA replication. In addition, the role of Spo0A on phage $\phi 29$ life cycle has been studied all along *B. subtilis* cell development. Surprisingly, it was found that $\phi 29$ development is suppressed in a subpopulation of vegetative growing cells in a *spo0A*-dependent way. *spo0A* was known to be bistably expressed during the early stages of sporulation and our findings reveal that it is also expressed in a bistable manner during vegetative growth. Moreover, evidence was obtained that *kinC* and to a minor extent *kinD* are responsible for this heterogeneous expression levels of *spo0A* during vegetative growth whose maximum levels are below the threshold to activate sporulation, but sufficient for suppression of the lytic cycle of $\phi 29$.

$\phi 29$ belongs to a family of phages that can be divided into three groups. Members of group 1 (e.g. $\phi 29$) and group 2 (e.g. Nf) infect *B. subtilis*. To determine if the alternative infection strategy is conserved in phages belonging to group 2, we studied phage Nf. The results obtained show that the lytic cycle of Nf is suppressed in a *spo0A*-dependent way but to a lesser extent than that observed for $\phi 29$. Sequence determination of the entire genome of Nf revealed that it contains only one perfect 0A box and two *parS* sites whereas the $\phi 29$ genome contains six perfect 0A boxes and five *parS* sites. By *in vitro* approaches we have shown that, contrary to $\phi 29$, Spo0A does not repress the early Nf C2 promoter and that the Nf A2b promoter is only slightly repressed at high Spo0A concentrations. In addition, contrary to $\phi 29$, Spo0A-mediated prevention of initiation of DNA replication is not observed in the Nf *in vitro* system. Therefore, the different adaptations of the life cycle of $\phi 29$ and Nf to the physiological state of the infected host are due to the differences in Spo0A-mediated regulation between these phages.

Finally, we have shown that Spo0A also functions as a direct inhibitor of *B. subtilis* initiation of chromosome replication.

Introducción

Dada la complejidad del mundo que nos rodea, los científicos siempre han hecho uso de modelos experimentales más sencillos que ayuden a conocer y entender cómo es su funcionamiento. El trabajo presentado en esta tesis trata sobre la interacción entre dos modelos experimentales básicos que han sido utilizados desde hace muchos años en Biología Molecular. Por un lado, la bacteria del suelo *Bacillus subtilis*, que es considerada un paradigma para el estudio de procesos de diferenciación, de regulación de la expresión génica y de morfogénesis celular, y por otro, el bacteriófago $\phi 29$ que es un excelente modelo para el estudio de procesos de transcripción y replicación del DNA.

1. La bacteria *Bacillus subtilis*

B. subtilis pertenece al género *Bacillus* que está formado por un gran número de especies de bacterias Gram-positivas, aerobias, formadoras de endo-esporas y habitantes del suelo o de material vegetal en descomposición, en la mayoría de los casos. En la actualidad se sabe que *B. subtilis* es capaz de desarrollarse en condiciones anaeróbicas (Tam et al., 2006). El hecho de que su nicho natural sea el suelo, hace que la bacteria esté sometida a continuos cambios en su entorno lo que le ha hecho desarrollar diferentes estrategias para responder a ellos. Algunas de estas estrategias son: la capacidad de moverse para buscar nuevas fuentes de nutrientes (Szurmant and Ordal, 2004), la capacidad de entrar en un estado de competencia natural en el cual puede absorber DNA exógeno e integrarlo en su genoma mediante recombinación homóloga (Grossman, 1995b; Hamoen et al., 2003; Claverys et al., 2006), o la capacidad de desarrollar lo que se ha llamado canibalismo durante el cual algunas bacterias de la población son capaces de provocar la lisis de bacterias de su misma especie y así poder hacer uso de los nutrientes que liberan (González-Pastor et al., 2003). Además, *B. subtilis*, al igual que muchas otras bacterias, ha desarrollado un comportamiento social por el cual las células son capaces de comunicarse entre ellas y dar lugar a estructuras multicelulares como son los enjambres de células (swarming) (Dixit et al., 2002; Kearns and Losick, 2003) y las biopelículas (Shapiro, 1998; Hamon and Lazazzera, 2001; Branda et al., 2001; Kearns et al., 2005), siendo probablemente estas últimas la forma más común de crecimiento en condiciones naturales (Costerton et al., 1995). Como última opción para sobrevivir a condiciones adversas *B. subtilis* pueden iniciar el proceso de esporulación el cual da como resultado la producción de esporas altamente resistentes que pueden permanecer en estado latente durante largos periodos de tiempo (recientemente revisado en, Piggot and Hilbert, 2004).

B. subtilis es además de gran importancia desde el punto de vista industrial, ya que produce gran cantidad de proteasas y es capaz de secretar proteínas heterólogas al medio (recientemente revisado en, van Wely et al., 2001).

Todas estas características, junto al hecho de ser una bacteria no patogénica, fácil de crecer en medios baratos y fácil de manipular genéticamente debido al proceso de competencia natural, han hecho que *B. subtilis* sea utilizada desde hace muchos años como un sistema modelo en biología.

En 1997 se completó la secuenciación de su genoma que fue llevada a cabo por un consorcio europeo/japonés (Kunst et al., 1997). Se secuenció el genoma de la estirpe denominada 168, que está disponible en el *Bacillus subtilis* Genetic Stock Center (1A700). El genoma de esta estirpe consiste en una molécula de DNA circular de doble cadena de 4.214.810 pares de bases (pb).

1.1 Proceso de esporulación

Como ya se ha mencionado, la diferenciación en tipos celulares específicos es uno de los mecanismos utilizados por muchas bacterias para responder a condiciones ambientales adversas. Una de las estrategias que posee *B. subtilis* para responder a estos cambios y que desarrolla como última opción para la supervivencia, es la formación de esporas. Este proceso ha sido estudiado en profundidad desde que en 1876 Robert Koch y Ferdinand Cohn publicaran la primera descripción morfológica de esporas de *B. subtilis* y *Bacillus anthracis* (Robert Koch and Ferdinand Cohn, 1876; Robert Koch, 1937). El proceso de esporulación da lugar a dos tipos celulares bien distintos: la pre-espora de pequeño tamaño y la célula madre que al final del proceso lisa liberando la espora madura al medio. La espora es una estructura muy resistente (Nicholson et al., 2000) en cuyo interior se mantiene intacto el material genético de la bacteria hasta que las condiciones vuelvan a ser favorables para el desarrollo de la bacteria y la espora germine.

El principal estímulo para que de comienzo el proceso de esporulación es la falta de fuentes de carbono, nitrógeno o fósforo (Piggot and Coote, 1976), pero es también importante que la densidad de población sea elevada (Grossman and Losick, 1988; Solomon et al., 1996). En realidad, no existe un único factor que sea el desencadenante del inicio del proceso, sino que la bacteria posee un sistema de detección de señales altamente complejo y sofisticado encargado de monitorizar las distintas señales ambientales. Una vez iniciado el proceso se tarda aproximadamente 7 horas a 37°C en la generación de la espora madura y el proceso es extremadamente costoso desde el punto de vista energético. Además, al contrario de lo que

ocurre en otros procesos de diferenciación, la esporulación es un proceso irreversible (Parker et al., 1996; Dworkin and Losick, 2005).

La esporulación se divide en varias fases definidas mediante la visualización al microscopio electrónico de mutantes bloqueados en diferentes momentos del proceso de diferenciación (Piggot and Coote, 1976).

- **Fase 0:** El estado 0 es la célula en estado vegetativo.
- **Fase I:** Las células completan la replicación de su genoma e inhiben el inicio de nuevas rondas de replicación. Los dos cromosomas replicados se extienden de polo a polo de la célula formando una estructura denominada filamento axial. (Bylund et al., 1993; Ben-Yehuda et al., 2003; Wu and Errington, 2003).
- **Fase II:** En esta fase se produce la división asimétrica que separa la célula madre de la pre-espora. En este momento, aproximadamente una tercera parte de uno de los cromosomas es atrapada en el interior de la pre-espora. El resto del cromosoma que formará parte de la espora necesitará ser transportado al interior mediante un sistema de transporte activo.
- **Fase III:** En esta fase el septo se va haciendo más fino y la célula madre va engullendo a la pre-espora que quedará en su interior en forma de protoplasto rodeada de dos membranas, una que proviene de la célula madre y otra del septo.
- **Fase IV:** Fase en la que se produce la deposición de dos capas de peptidoglicano en el espacio entre las dos membranas.
- **Fase V:** Deposición de proteínas en la capa externa de la espora que dan lugar a la cubierta de la espora (Henriques and Moran, 2000).

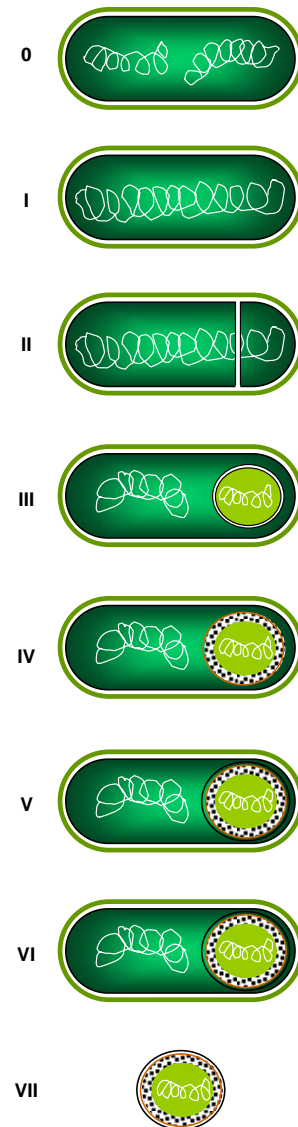


Figura 1. Etapas de la esporulación

- **Fase VI:** Etapa en la que se produce la maduración de la espora que implica la adquisición de las propiedades que la hacen tan resistente (Nicholson and Setlow, 1990).
- **Fase VII:** Etapa en la que se produce la lisis de la célula madre liberándose la espora madura al medio.

El desarrollo de las distintas fases viene determinado por la activación secuencial y alternada de distintos factores sigma alternativos en la pre-espora y en la célula madre que dan lugar a patrones específicos de expresión génica en ambos compartimentos (recientemente revisado en, Hilbert and Piggot, 2004).

1.2 Sistemas de dos componentes y cascadas de fosfatos

Los sistemas de dos componentes y las cascadas de fosfatos son mecanismos por los cuales los microorganismos son capaces de sentir los estímulos del medio externo e interno y de responder a ellos regulando distintos patrones de expresión génica. La mayoría de los procesos de diferenciación que desarrolla *B. subtilis* están regulados por sistemas de este tipo.

Los sistemas de dos componentes comprenden una quinasa de histidina y un regulador de respuesta que normalmente actúa como regulador transcripcional. La quinasa de histidinas detecta los diferentes estímulos y responde a ellos mediante la autofosforilación en un residuo de histidina conservado. La estructura de estas quinasas comprende dos dominios: un dominio N-terminal, denominado dominio sensor, que en algunos casos está unido a la membrana y situado en la parte externa de la misma (Trach and Hoch, 1993), y un dominio C-terminal donde reside la capacidad de autofosforilación. A su vez este dominio C-terminal se divide en un dominio C-terminal catalítico y de unión a ATP, y un dominio N-terminal de dimerización y de transferencia del grupo fosforilo. La forma activa de estas quinasas es en forma de homodímeros y una vez fosforilado uno de los monómeros, el grupo fosforilo es transferido al otro monómero que es el encargado de transferirlo a un residuo de aspartato de su regulador de respuesta. La mayoría de los reguladores de respuesta consisten en una sola cadena polipeptídica que una vez plegada da lugar a dos dominios de tamaño similar, un dominio receptor N-terminal que contiene el Asp conservado que será fosforilado y un dominio efector C-terminal donde reside la capacidad de unión al DNA. La fosforilación provoca su activación que da como resultado final un cambio en la expresión génica. La diferencia fundamental entre los sistemas de dos componentes y las cascadas de fosfatos radica en que en estas últimas están involucradas más proteínas reguladoras. Esto hace que suelen estar implicadas en procesos de

diferenciación sujetos a la acción de múltiples estímulos y, por tanto, cuya activación deba estar muy regulada, como es el caso del proceso de esporulación.

1.3. La cascada de fosfatos del proceso de iniciación de esporulación

El regulador esencial del proceso de esporulación es la proteína Spo0A. Su activación por fosforilación depende de una cascada de fosfatos en lugar de un sistema de dos componentes. Muy probablemente esto es debido a que su inicio tiene que estar muy regulado debido a que es un proceso irreversible, que consume mucha energía y requiere mucho tiempo, y que es iniciado como respuesta a diversos estímulos. Esta cascada de fosfatos está compuesta por cinco quinasas sensoras, KinA, KinB, KinC, KinD y KinE (Trach et al., 1991; LeDeaux and Grossman, 1995; Jiang et al., 2000), por un regulador de respuesta llamado Spo0F y por una fosfo-proteína fosfotransferasa, Spo0B, que transfiere el grupo fosforilo de Spo0F a Spo0A (Burbulys et al., 1991). Las quinasas son las encargadas de recibir las señales del medio y, probablemente, cada una de ellas responda a estímulos diferentes, aunque aún son desconocidos (Jiang et al., 2000). Una vez autofosforiladas, las quinasas transfieren el grupo fosforilo a un residuo de aspartato del regulador de respuesta Spo0F. La proteína Spo0F presenta alta homología con los reguladores de respuesta clásicos de los sistemas de regulación de dos componentes (Trach et al., 1985) aunque difiere de la mayor parte de ellos en que carece de un dominio C-terminal de unión a DNA. A continuación es la fosfotransferasa Spo0B la encargada de transferir el grupo fosfato desde Spo0F~P al residuo Asp⁵⁶ de Spo0A dando lugar a Spo0A~P (Burbulys et al., 1991).

Además de estas proteínas que están directamente implicadas en la transferencia de fosfatos, se han descrito otras proteínas capaces de actuar como reguladores de la cascada. Por un lado se ha descrito un inhibidor de quinasas denominado Sda (Burkholder et al., 2001) (ver más adelante). Por otro lado existen fosfatasas que defosforilan directamente las proteínas Spo0F~P (Ishikawa et al., 2002) o Spo0A~P (Ohlsen et al., 1994). Algunos miembros de la familia Rap de aspartil-fosfatasas son capaces de defosforilar Spo0F~P (Perego and Hoch, 2002). Spo0E, YisI y YnzD, pertenecientes a la familia de las fosfatasas de Spo0E, se encargan de la defosforilación de Spo0A~P (Ohlsen et al., 1994; Perego, 2001).

1.4. La proteína Spo0A

La proteína Spo0A es el regulador esencial de entrada en esporulación en *B. subtilis* y está implicada también en la regulación de otros procesos de diferenciación como son la formación de biopelículas y el canibalismo. La expresión de Spo0A tiene lugar a partir de dos

promotores. El promotor vegetativo, denominado P_v , es reconocido por RNA polimerasas que contengan el factor sigma constitutivo σ^A , y el promotor de esporulación o P_s , por RNA polimerasas que contengan el factor sigma alternativo σ^H . Estos dos promotores están separados por 148 pb y la transcripción cambia del promotor vegetativo al promotor de esporulación pronto en el inicio de la esporulación. Como se explicará en detalle más adelante, Spo0A en su forma activa es capaz de unirse al DNA actuando como regulador transcripcional. Así, es la proteína responsable de la represión del promotor vegetativo y de la activación del promotor de esporulación que tiene lugar durante el proceso de esporulación (Strauch et al., 1992). Es decir, Spo0A regula la expresión de su propio gen.

La proteína Spo0A de *B. subtilis* consiste en una sola cadena polipeptídica de 29,5 kDa que una vez plegada da lugar a dos dominios de tamaño similar, un dominio receptor N-terminal que contiene el Asp⁵⁶ que será fosforilado, y un dominio efector C-terminal donde reside la capacidad de unión al DNA (Grimsley et al., 1994; Lewis et al., 1999; Lewis et al., 2000). Las estructuras tridimensionales de ambos dominios y del dominio efector unido al DNA han sido resueltas (Lewis et al., 1999; Lewis et al., 2000; Zhao et al., 2002). La fosforilación de Spo0A provoca cambios en la estructura del dominio N-terminal induciendo la dimerización y liberando el dominio C-terminal de tal forma que queda expuesta la región de interacción con el DNA y así puede ejercer su función reguladora (Lewis et al., 2002; Muchová et al., 2004).

Spo0A en su forma activa reconoce unas secuencias específicas en el DNA denominadas “cajas 0A” (Hoch, 1993) cuya secuencia consenso originalmente descrita es 5'-TGTCGAA-3' (Strauch et al., 1990). Una vez unida al DNA, Spo0A regula el inicio de la esporulación tanto activando como reprimiendo la expresión de genes. Spo0A está involucrada en otros procesos de diferenciación además de la esporulación, lo que explica que la expresión de 520 genes del genoma de *B. subtilis* esté influida por Spo0A (Fawcett et al., 2000; Liu et al., 2003). De estos 520 genes, 121 están directamente regulados por Spo0A (Molle et al., 2003). Los genes regulados directamente por Spo0A se dividen en función de la cantidad de proteína activa que necesitan para ser activados o reprimidos (Fujita et al., 2005). Así, hay genes que necesitan niveles altos de Spo0A~P para ser activados o para ser reprimidos, y otros que necesitan niveles bajos de la proteína activa para ser regulados. Por norma general, los genes directamente implicados en el proceso de esporulación necesitan altos niveles de Spo0A~P para ser activados, mientras que los genes que participan en procesos auxiliares como el canibalismo (González-Pastor et al., 2003) y la formación de biopelículas necesitan cantidades más bajas (Branda et al., 2001; Fujita et al., 2005). Esta respuesta diferente a cantidades de la proteína activa implica una expresión y activación gradual de la misma, lo cual se consigue mediante la cascada de fosfatos que regula su fosforilación. Así, el aumento gradual en la cantidad de Spo0A activa permite que los genes que responden a baja cantidad sean activados o reprimidos

antes que los genes directamente implicados en el proceso de esporulación que responden a cantidades más altas de Spo0A activada (Fujita and Losick, 2005).

1.5. La esporulación como proceso biestable

Tradicionalmente la expresión génica en bacterias se ha estudiado en cultivos enteros dando como resultado la idea de que todas las células sometidas a las mismas condiciones presentan una expresión génica uniforme. El desarrollo de técnicas que permiten la visualización de la expresión de genes en células individuales ha puesto de manifiesto que células genéticamente idénticas y sometidas a las mismas condiciones se comportan de forma heterogénea con ciertos genes expresados de forma muy distinta dentro de la misma población. En algunos casos, esta expresión heterogénea hace que la población se diferencie en distintas subpoblaciones, lo que se ha denominado biestabilidad. Una característica importante de la biestabilidad es su naturaleza epigenética en contraposición con otros procesos generadores también de heterogeneidad, denominados “*phase variation*”, cuya causa última reside en variaciones a nivel de alteraciones reversibles del genoma. Modelos teóricos y estudios llevados a cabo tanto en organismos procarióticos como eucarióticos han demostrado que la biestabilidad es consecuencia de la existencia de bucles de autoestimulación de la activación de un regulador transcripcional junto con una respuesta no lineal al mismo (Hasty et al., 2000; Attila Becskei, 2001; Isaacs et al., 2003). Fluctuaciones estocásticas en la expresión del regulador (ruido) harán que sólo algunas células alcancen el umbral necesario para activar el bucle de autoestimulación dando lugar a un cambio en su expresión génica (Ferrell, 2002; Rao et al., 2002).

La esporulación es un proceso biestable. En un cultivo isogénico de *B. subtilis*, algunas células presentan niveles altos de expresión y fosforilación de la proteína Spo0A, mientras que otras células presentan niveles más bajos (Chung et al., 1994). Esto da lugar a que la población se bifurque en dos tipos celulares; por un lado, células que entran en esporulación (células que presentan altos niveles de Spo0A activa) y por otro, células que no inician el proceso (células que presentan niveles bajos de Spo0A activa). Además, las características de los mecanismos que llevan a la expresión y activación de Spo0A y, por tanto, a la iniciación de la esporulación, responden a las de un proceso biestable. Por un lado, la propia proteína en su forma activa genera un bucle de autoestimulación de su síntesis modulando la expresión de su propio gen, cambiando la expresión desde el promotor débil P_v al promotor fuerte P_s (ver arriba, apartado 1.4.). Por otro, Spo0A regula la expresión de distintos componentes de la cascada de fosfatos responsable de su fosforilación, siendo por tanto también capaz de modular su activación (Figura 2).

1.6. División celular durante la esporulación

El proceso de división celular varía bastante entre las células que se encuentran en la fase exponencial y las células que están iniciando la esporulación. Mientras que en fase vegetativa la división se produce en la zona central de la bacteria dando lugar a dos células hijas de tamaño idéntico, el proceso de esporulación requiere una división asimétrica cerca de uno de los polos dando lugar a la célula madre de mayor tamaño y a la pre-espora.

Durante el crecimiento vegetativo, lo primero que tiene lugar para la división celular simétrica es la polimerización del anillo de la proteína del tipo tubulina FtsZ en el centro de la bacteria (de Boer et al., 1992; RayChaudhuri and Park, 1992; Mukherjee et al., 1993). Este anillo formado en la cara interna de la membrana citoplasmática media la división reclutando al resto de proteínas implicadas en el proceso que darán lugar a la formación del septo (recientemente revisado en, Barak and Wilkinson, 2007). La formación del anillo de FtsZ sólo en la zona central de la célula durante el crecimiento vegetativo viene determinado en *B. subtilis* por dos sistemas. Por un lado está la proteína Noc que es una proteína que se une al DNA de manera inespecífica y co-localiza con el nucleoide a lo largo de todo el desarrollo de la bacteria (Sievers et al., 2002). Esta proteína inhibe la polimerización de FtsZ en las proximidades del nucleoide por un mecanismo aún desconocido (Wu and Errington, 2004). Por otro lado, está el sistema MinCD-DivIVA (Edwards and Errington, 1997; Cha and Stewart, 1997). La proteína MinC es un inhibidor de la división ya que interacciona con la proteína FtsZ impidiendo la formación del anillo (Levin et al., 1992; Varley and Stewart, 1992; Barak et al., 1998; Levin et al., 1998) y MinD es una ATPasa que activa MinC (de Boer et al., 1991). MinD se asocia con MinC y es el complejo MinC-MinD el que inhibe la polimerización de FtsZ (Raskin and de Boer, 1997). DivIVA se asocia de forma estable con los polos y recluta al complejo MinCD probablemente a través de interacciones con MinD (Marston et al., 1998; Karoui and Errington, 2001). Así, la acción conjunta de los dos sistemas restringe la polimerización del anillo de FtsZ y posterior formación del septo a la zona central de la célula en división. Sin embargo, durante el proceso de esporulación se requiere la formación del septo en las proximidades de uno de los polos. Durante las etapas iniciales de la esporulación el anillo de FtsZ se forma en las proximidades de ambos polos aunque sólo uno de ellos dará lugar a la formación del septo. El cambio de división simétrica a división asimétrica es mediado por Spo0A (Levin and Losick, 1996), aunque no se conoce mucho sobre el mecanismo. Probablemente, Spo0A regula la expresión de uno o varios genes aún desconocidos que sean capaces de contrarrestar el mecanismo inhibitorio de formación del septo en los polos de la célula mediado por el sistema MinCD. Aunque se sabe que mutaciones en *minC* y *minD* tienen poco efecto sobre la esporulación (Barak et al., 1998), sus niveles de expresión bajan durante la esporulación (Perry

and Edwards, 2004), lo que podría tener alguna función en la decisión de cambiar a división polar. No obstante, el hecho de que en células mutantes en *minD* que están iniciando la esporulación aparezca el septo en posición central en lugar de en posición polar sugiere que el sistema MinCD puede tener un papel auxiliar en el posicionamiento del septo durante la esporulación (Barak et al., 1998; Errington, 2001; Thomaidis et al., 2001a).

1.7. Inicio de la replicación del cromosoma de *B. Subtilis*

Un inicio satisfactorio de la esporulación requiere una estrecha coordinación entre la duplicación del cromosoma y la división celular asimétrica. Las células que han iniciado la esporulación deben completar una última ronda de replicación para asegurar que la célula contenga dos y sólo dos copias del cromosoma de tal forma que una de ellas pase a formar parte de la espora y la otra de la célula madre, donde darán lugar a patrones de expresión génica diferentes.

La replicación de los cromosomas bacterianos tiene lugar una vez por cada ciclo de división celular respondiendo a señales que están íntimamente ligadas a la masa celular (Boye et al., 1996). La replicación de un cromosoma bacteriano circular comienza en un único sitio denominado origen de replicación (*oriC*), se lleva a cabo de forma bidireccional y termina en la región del cromosoma opuesta al origen, denominada terminador o *terC*. La región del terminador contiene varias repeticiones de una secuencia de DNA llamadas sitios *ter* a las cuales se une la proteína RTP provocando un bloqueo en una de las horquillas de replicación (Duggin et al., 1999).

La proteína DnaA es esencial para la iniciación de la replicación. El gen *dnaA*, que está localizado en la región del *oriC*, está muy conservado incluso entre géneros distantes evolutivamente hablando (Skarstad and Boye, 1994). De hecho, aunque *B. subtilis* y *Escherichia coli* son organismos distantes desde un punto de vista evolutivo, la secuencia primaria de DnaA es altamente homóloga. En base a la homología de la secuencia primaria, se han definido cuatro dominios (Ogasawara and Yoshikawa, 1992) de los cuales el C-terminal es el que posee la capacidad de reconocimiento y unión al DNA (Krause et al., 1997; Roth A, 2007).

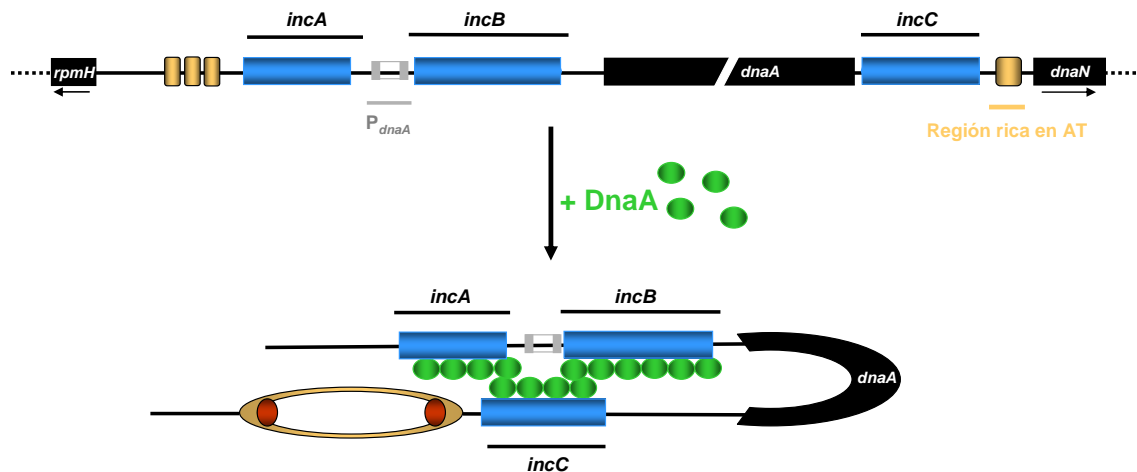


Figura 3. Modelo de la iniciación de la replicación del DNA cromosómico de *B. subtilis*. La proteína DnaA (verde) se une a las cajas de DnaA situadas en el *oriC* de *B. subtilis*. DnaA se une a las cajas localizadas en las regiones denominadas *incA*, *incB* e *incC* (rectángulos azules) provocando la formación de un bucle mediante interacciones entre las moléculas unidas a *incA* e *incB* y las unidas a *incC*. Este bucle facilita la apertura de la doble hélice del DNA en la región rica en AT próxima a *incC*. Una vez abierta la doble hélice, DnaA recluta al complejo del primosoma (rojo). Los rectángulos naranjas cercanos a *incA* representan las repeticiones de 16 pb ricas en bases AT. Los distintos genes de la región del *oriC* aparecen en negro.

En la región del *oriC* del cromosoma de *B. subtilis* y de otras bacterias existen varios sitios de unión de la proteína iniciadora denominados “cajas de DnaA” cuya secuencia consenso es 5'-TTATCCACA-3' (Fuller et al., 1984; Ogasawara N, 1985; Yoshikawa and Ogasawara, 1991). En el origen de replicación del cromosoma de *B. subtilis* las secuencias de unión de DnaA están agrupadas en dos regiones no codificantes situadas *upstream* y *downstream* del gen *dnaA* (Figura 3). La región *upstream* del gen está dividida a su vez en dos subconjuntos de cajas de DnaA denominados Incompatibilidad A y B (*incA* e *incB*). La región *downstream* se denominó a su vez Incompatibilidad C (*incC*). La denominación de regiones de incompatibilidad viene de la competitividad que se observa entre la replicación del cromosoma y la de un plásmido que contiene en su secuencia cualquiera de estas tres regiones (Moriya et al., 1988). Estas tres regiones de incompatibilidad presentan diferentes afinidades por la proteína DnaA, siendo la región de *incB* la que presenta una afinidad más alta. Las tres regiones son necesarias para la iniciación de la replicación (Moriya et al., 1992). La unión de DnaA a las cajas DnaA da lugar a formación de un complejo nucleoprotéico que provoca la apertura de la doble hélice de DNA en un sitio cercano rico en bases AT (Fukuoka et al., 1990; Kornberg and Baker, 1992; Kelman and O'Donnell, 1995; Krause et al., 1997; Baker and Bell, 1998; Messer, 2002). Probablemente, la unión de DnaA a *incA*, *incB* e *incC* provoca la interacción entre las moléculas unidas a la región *upstream* (*incA* e *incB*) y las unidas a la región *downstream* del gen

de *dnaA* (*incC*) generando la formación de un bucle entre las dos regiones que en último término causa la apertura de la doble hélice de DNA en la región de 27 pb rica en AT situada a una distancia de 14 pb de *incC* (Krause et al., 1997; Moriya et al., 1999; Messer, 2002). En *E. coli*, la formación del complejo abierto de replicación es estimulado por la proteína tipo histona HU (Hwang and Kornberg, 1992). Asimismo, Krause et al. (1997) describieron que la proteína homóloga de *B. subtilis* llamada HBSu estimula el proceso de apertura de la doble hélice en el inicio de la replicación del cromosoma de *B. subtilis in vitro*. Una vez abierta la doble hélice, es también la proteína DnaA la encargada de reclutar a la DNA helicasa (DnaC en *B. subtilis*) y al resto de componentes del primosoma (Sueoka, 1998; Imai et al., 2000; Ishigo-oka et al., 2001). Una vez que la helicasa está situada en el *oriC*, se produce el ensamblaje de las proteínas que constituyen el sistema del replisoma, que es la maquinaria responsable de la elongación de la replicación (Baker and Bell, 1998).

Como ya se ha mencionado, la replicación está estrechamente coordinada con la tasa de crecimiento celular por lo que bajo condiciones en las que se desencadena la esporulación, se requiere una parada en la iniciación de nuevas rondas de replicación. Por tanto, es esperable la existencia de algún mecanismo que inhiba la iniciación de nuevas rondas de replicación una vez que se ha iniciado el proceso de esporulación. Hace unos años se describió la proteína Sda como un inhibidor de quinasas de esporulación (Burkholder et al., 2001). Su expresión está regulada directamente por la proteína DnaA y se produce en respuesta a defectos en la maquinaria iniciadora de la replicación y en respuesta a daños en el DNA. Esta proteína de pequeño tamaño interacciona con el dímero de KinA y probablemente también con el dímero de KinB, actuando como una especie de barricada que bloquea la interacción entre el dominio catalítico y el dominio fosfotransferasa de la quinasa (Rowland et al., 2004; Whitten et al., 2007). Esto previene la autofosforilación de la quinasa que en último término provoca una inhibición de la cascada de fosfatos que lleva a la fosforilación de Spo0A. Por tanto, esta proteína actúa como punto de control que inhibe el inicio de la esporulación ante problemas en la replicación. Pero no parece ser este el mecanismo que prevenga la parada en el inicio de nuevas rondas de replicación necesario para el comienzo de la esporulación. Como se explica en el apartado 3.2. de Resultados de esta tesis, es la propia proteína Spo0A la responsable de la parada en el inicio de nuevas rondas de replicación durante la esporulación.

1.8. Segregación del cromosoma

El genoma de *B. subtilis* consiste en un cromosoma circular de doble cadena de aproximadamente 4,2 millones de pb. En las células que se encuentran en fase de crecimiento exponencial, a medida que se va produciendo la duplicación de las regiones próximas al *oriC*

éstas se van separando y van migrando hacia zonas cercanas a los polos (Webb et al., 1997; Lin et al., 1997; Glaser et al., 1997; Lewis and Errington, 1997; Niki and Hiraga, 1997; Mohl and Gober, 1997; Gordon et al., 1997; Sharpe and Errington, 1998; Teleman et al., 1998; Jensen and Shapiro, 1999; Niki et al., 2000). Sin embargo, en las células que están esporulando, es necesario que el DNA sea anclado a los polos de la célula para que una copia del cromosoma pueda ser insertado en el interior de la espora.

Este proceso de segregación del cromosoma en la pre-espora se divide en varias etapas (Figura 4, Wu and Errington, 1994; Wu et al., 1995; Pogliano et al., 2002). Primero, al inicio de la esporulación el nucleóide forma una estructura conocida como filamento axial que se extiende hacia los polos de la célula. En esta estructura las regiones próximas al *oriC* se localizan en las zonas más cercanas a los polos (Glaser et al., 1997). A continuación se produce el anclaje del cromosoma a los polos y la formación del septo que atrapa alrededor de un tercio del cromosoma en el interior de la pre-espora. El resto del cromosoma es transportado posteriormente al interior de la espora por un mecanismo de transporte activo.

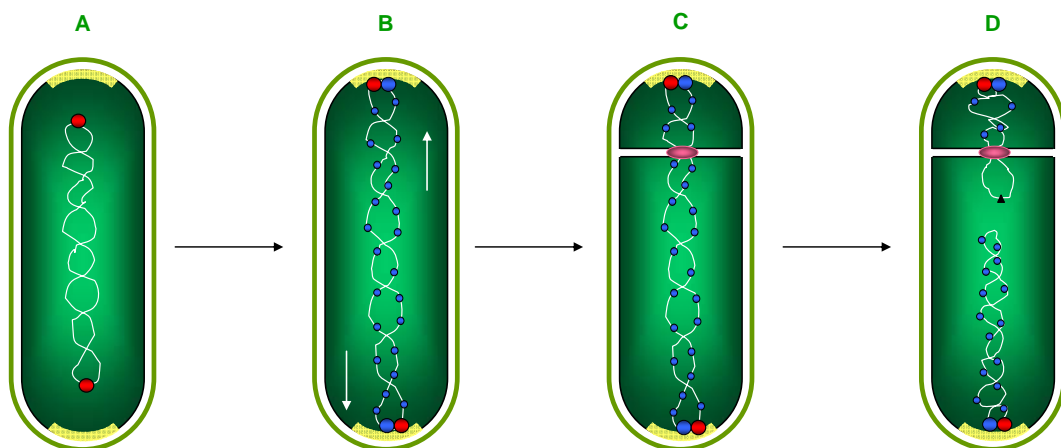


Figura 4. Modelo de la segregación del cromosoma durante la esporulación. **A.** Célula en estado vegetativo. La proteína Spo0J (rojo) se une a la región del *oriC* formando unos complejos que son importantes para la segregación del cromosoma. Los complejos *oriC*/Spo0J (rojo) se sitúan en las regiones correspondientes a aproximadamente un cuarto y tres cuartos de la célula. **B.** Durante las primeras etapas de la esporulación, el *oriC* se desplaza hacia los polos de la célula (formación del filamento axial) y es anclado a los polos mediante la acción coordinada de Soj (no mostrada), RacA (azul) y DivIVA (amarillo). **C.** La división asimétrica atrapa aproximadamente un tercio del cromosoma en el interior de la pre-espora. **D.** La proteína SpoIIIE (rosa) es reclutada al septo y es la responsable de translocar el resto del cromosoma al interior de la pre-espora, completando la segregación del cromosoma al interior de la pre-espora.

La proteína DivIVA se encuentra localizada en los polos de la célula a lo largo de todo el desarrollo de la bacteria. Durante el crecimiento vegetativo juega un papel importante en la localización del septo en posición central y al inicio de la esporulación actúa como marcador de los polos y como mecanismo de anclaje del *oriC* a los mismos (Quisel et al., 1999; Thomaidis

et al., 2001b). Sin embargo, no parece estar interactuando directamente con el DNA. RacA es otra proteína implicada en la segregación del cromosoma durante la esporulación (Ben-Yehuda et al., 2003). Su transcripción es activada en las fases tempranas de esporulación de manera dependiente de Spo0A y σ^H (Fawcett et al., 2000). Esta proteína se une a sitios específicos del cromosoma localizados en la región del *oriC* denominados sitios *ram* (RacA binding Motif) (Ben Yehuda et al., 2005). Se cree, aunque todavía no se ha conseguido tener una evidencia directa, que RacA es capaz de interactuar con DivIVA dando lugar a una unión estable entre el *oriC* y DivIVA, por tanto una unión estable entre el *oriC* y los polos de la célula. Las proteínas Soj y Spo0J son proteínas homólogas a las proteínas plasmídicas de la familia ParA y ParB, respectivamente, que están implicadas en la segregación de plásmidos (Ogura and Hiraga, 1983; Abeles et al., 1985; Ogasawara and Yoshikawa, 1992; Draper and Gober, 2002). Las proteínas Soj y Spo0J están también implicadas en la segregación del cromosoma, tanto durante el crecimiento vegetativo (Ireton et al., 1994) como durante la esporulación (Sharpe and Errington, 1996), aunque no se conoce en detalle su mecanismo molecular. La proteína ParA del sistema de segregación de plásmidos es una ATPasa que interactúa con el DNA y con la proteína ParB. ParB reconoce unos sitios específicos de unión en el DNA denominados sitios *parS*. La proteína ParA en su forma unida a ADP es capaz también de interactuar de forma inespecífica con su propio promotor actuando como un represor transcripcional (Bouet and Funnell, 1999; Fung et al., 2001). La proteína Spo0J (ParB) se une a secuencias concretas en el DNA cromosómico de *B. subtilis* denominados sitios *parS* (Lin and Grossman, 1998) cuya secuencia consenso es una repetición invertida imperfecta 5'-TGTTCCACGTGAAACA-3'. Alrededor del *oriC*, en una región de aproximadamente 800 kbp, se localizan 10 sitios con secuencias prácticamente iguales a la de los sitios *parS* (Lin and Grossman, 1998). La unión de Spo0J *in vivo* se ha demostrado para ocho de estos sitios. Recientemente se ha descrito la existencia de dos sitios *parS* adicionales fuera de esta región (Breier and Grossman, 2007). Actualmente se cree que Spo0J está implicada en la organización del *oriC* en colaboración con Soj (Murray et al., 2006) y probablemente también en la segregación de los orígenes de replicación hacia la región de los polos, tanto durante el crecimiento vegetativo como durante la esporulación uniéndose a los sitios *parS*. Soj (ParA) es una proteína que se encuentra asociada con el DNA uniéndose de forma inespecífica y es capaz de saltar de nucleóide a nucleóide vía los polos de una forma muy cooperativa. Esta oscilación de Soj es estimulada por Spo0J y en ausencia de esta última, Soj se asocia de manera estática con el DNA produciendo la represión de determinados genes de iniciación de esporulación incluyendo el gen *spo0A* (Cervin et al., 1998; Marston and Errington, 1999; Quisel et al., 1999; Quisel and Grossman, 2000; Real et al., 2005). Por tanto, además de su papel en la segregación, probablemente el sistema Spo0J/Soj también esté actuando como un sistema de control que prevenga el inicio de la esporulación

mediante la represión mediada por Soj de determinados genes ante ciertas circunstancias como pueda ser un problema en la replicación del cromosoma (Ireton and Grossman, 1994; Ireton et al., 1994). Por último, la translocasa de DNA SpoIIIE es la proteína responsable del transporte al interior de la espora de la porción del cromosoma que ha quedado en la célula madre tras la formación del septo (Wu and Errington, 1994).

2. El bacteriófago ϕ 29

El bacteriófago ϕ 29 es utilizado desde hace varias décadas como sistema modelo en Biología Molecular, especialmente para estudios de procesos de replicación y transcripción del DNA. ϕ 29 pertenece a la familia de fagos Podoviridae, al género de fagos denominando ϕ 29-like. Este género está dividido en tres grupos atendiendo a las propiedades serológicas, a los mapas físicos de DNA, a los mapas peptídicos y a la secuencia del DNA (Yoshikawa et al., 1985; Yoshikawa et al., 1986; Pecenkova and Paces, 1999; Meijer et al., 2001a). Así, el denominado grupo 1 está formado por los fagos ϕ 29, ϕ 15, PZA y BS32; el grupo 2 incluye los fagos B103, Nf y M2Y y el grupo 3 comprende un solo miembro denominado GA-1. Todos los miembros de los grupos 1 y 2 infectan la especie *B. subtilis* entre otras. Sin embargo, el huésped del fago GA-1 es una especie de la familia *Bacillus* muy relacionada con *Bacillus pumilus* llamada G1R. Los fagos pertenecientes a esta familia son los fagos más pequeños que han sido aislados capaces de infectar miembros del género *Bacillus* siendo también los más pequeños que contienen un DNA de doble cadena (dsDNA).

El bacteriófago ϕ 29 es considerado un fago lítico. La infección comienza con la adsorción del fago a la bacteria mediante el reconocimiento de receptores presentes en la pared bacteriana. A continuación se produce la inyección del genoma del fago. El genoma de ϕ 29 consiste en un DNA lineal de doble cadena de 19.285 pb con una proteína terminal (TP) unida covalentemente a los extremos 5'. La direccionalidad de la inyección es siempre desde el extremo derecho al extremo izquierdo y el proceso tiene lugar en dos etapas (González-Huici et al., 2004). En la primera etapa se produce la inyección de aproximadamente un 65% del genoma del fago mediada muy probablemente por la presión generada en el interior de la cápsida del virus. En la segunda etapa se produce la inyección del resto del genoma con la ayuda de proteínas del fago codificadas por genes del extremo derecho del DNA. En el interior de la bacteria se llevan a cabo los procesos de replicación y transcripción del DNA. La replicación se lleva a cabo por un mecanismo denominado replicación mediada por proteína (explicada con detalle más adelante) en el que la TP unida a los extremos actúa como cebador en el inicio de la replicación. Este sistema de replicación está conservado en otros genomas que poseen también

un DNA lineal con una proteína unida covalentemente en los extremos 5' como son algunos virus eucarióticos como el adenovirus y hepadnavirus, algunos fagos como Cp-1 y PRD1 que infectan *Streptococcus pneumoniae* y *Escherichia coli*, respectivamente, plásmidos lineales, así como el cromosoma lineal de *Streptomyces lividans* (revisado en, Salas, 1991). La transcripción del DNA del fago tiene lugar en una etapa temprana y una tardía, denominadas así en función del momento en que se produce durante el ciclo infectivo. La transcripción tardía da lugar, entre otras, a las proteínas responsables de la lisis de la célula infectada. Así, su activación provoca la liberación al medio de partículas infectivas de $\phi 29$ capaces de iniciar un nuevo ciclo de infección.

2.1. Organización genética y transcripcional

Por norma general, el genoma de los fagos presenta los genes con funciones relacionadas agrupados en operones (Ackermann, 1998). Esta característica se cumple en el genoma de $\phi 29$. Así, su DNA presenta los genes agrupados en dos operones tempranos localizados en ambos extremos del genoma y un operón tardío situado en la parte central del mismo. Los operones tempranos dan lugar a la síntesis de las proteínas implicadas en la replicación y en la regulación de la transcripción, entre otras. El operón tardío contiene los genes que codifican a las proteínas estructurales del fago, las implicadas en la morfogénesis del fago y las responsables de la lisis de la bacteria. La transcripción la lleva a cabo la σ^A -RNA polimerasa (RNAP) de la bacteria. El cambio de transcripción temprana a tardía está regulado por proteínas tempranas del fago.

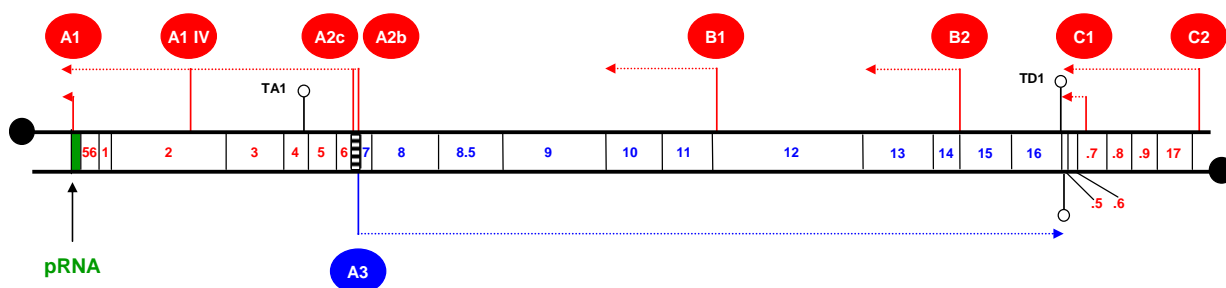


Figura 5. Mapa genético y transcripcional de ϕ 29. Los genes tempranos, así como los promotores desde los cuales se transcriben están indicados en rojo. Los genes tardíos y el promotor tardío A3 están indicados en azul. Las líneas discontinuas indican la dirección de la transcripción desde los distintos promotores. Los terminadores transcripcionales más importantes están indicados mediante horquillas. La caja verde en el extremo izquierdo indica la región que codifica para el pRNA. La caja negra rayada indica la región intergénica donde se localizan los promotores A2c, A2b y A3. Los círculos negros en ambos extremos representan la TP. Los genes u ORF 16.9, 16.8, 16.7, 16.6 y 16.5 localizados en el operón temprano del extremo derecho están indicados como .9, .8, .7, .6 y .5.

- Transcripción temprana

Los genes tempranos se encuentran agrupados en dos operones que se transcriben a partir de la misma cadena del DNA. Uno de estos dos operones está situado en el extremo derecho del genoma y se transcribe a partir del promotor denominado C2. Este promotor es el primero en ser transcrito, antes incluso de que se complete la inyección del DNA del fago en la célula (González-Huici et al., 2006). Desde este promotor tiene lugar la transcripción de los genes que codifican a las proteínas p17 y p16.7. Ambas proteínas están implicadas en el proceso de inyección del genoma del fago durante la infección (González-Huici et al., 2004; Alcorlo et al., 2007) y en la replicación del DNA del fago (Meijer et al., 2000; Meijer et al., 2001b; Serna-Rico et al., 2002; Serna-Rico et al., 2003; González-Huici et al., 2006). En esta región existen otras fases de lectura abierta que se han denominado 16.9, 16.8, 16.6 y 16.5 que podrían codificar a otras proteínas. Mientras que desde el promotor C2 se producen transcritos que codifican a las 6 posibles proteínas mencionadas anteriormente, las fases de lectura abierta 16.6 y 16.5 también pueden ser transcritas a partir de un promotor adicional débil denominado C1 que está localizado en el gen *16.7* (Sogo et al., 1979; Mellado et al., 1986b).

El otro operón temprano se encuentra situado en el extremo izquierdo del genoma y su transcripción tiene lugar a partir de dos promotores fuertes denominados A2b y A2c. Este operón contiene los genes que codifican a las cuatro proteínas esenciales para la replicación del genoma del fago que son la proteína p2, que es la DNA polimerasa (DNAP), la proteína p3, que es la TP, la p5, que es la proteína de unión a DNA de banda simple (SSB) y la proteína p6, que es la proteína de unión a DNA de banda doble (DBP) y funciona como activadora de la replicación, participa también en el cambio de transcripción temprana a tardía y reprime el promotor temprano C2. Además, este operón contiene los genes *4*, *1* y *56* y dos fases de lectura abierta que podrían codificar a otras proteínas. El gen *4* codifica a la proteína p4 que es el regulador transcripcional fundamental para el cambio de la transcripción temprana a tardía (Barthelemy et al., 1987). El gen *56* codifica la proteína p56 cuya función como inhibidora de la actividad de la uracil-DNA glicosilasa de *B. subtilis* ha sido descrita recientemente (Serrano-Heras et al., 2007). El gen *1* codifica a la proteína p1 que está implicada en la asociación de la

replicación del genoma viral a la membrana bacteriana (Bravo and Salas, 1997). Los genes *I* y *56* y las dos fases de lectura abierta situadas *downstream* del gen *56* pueden ser transcritos, además de desde los promotores A2c y A2b, desde un promotor débil denominado A1IV (Sogo et al., 1979; Mellado et al., 1986b).

En el extremo izquierdo del genoma se localiza también el promotor A1 que es un promotor fuerte que se expresa a lo largo de todo el ciclo de infección y que dirige la transcripción de un RNA de 174 nucleótidos llamado pRNA que está implicado en el empaquetamiento del DNA viral en la cápsida (revisado en, Guo, 2002).

En la región central del genoma se localizan dos promotores adicionales llamados B1 y B2 que dan lugar a transcritos antisentido que podrían estar regulando la expresión de algunos genes tardíos (Sogo et al., 1979; Mellado et al., 1986a; Barthelemy et al., 1988).

- Transcripción tardía

El operón tardío codifica a los genes *7* a *16* y está situado en la región central del genoma. Estos genes codifican las proteínas estructurales del fago, las proteínas implicadas en la morfogénesis del fago y las proteínas necesarias para la lisis del huésped. La transcripción se produce desde la cadena de DNA contraria a la de la transcripción temprana y está bajo el control de un único promotor denominado A3 (Sogo et al., 1979; Mellado et al., 1986b). A diferencia de los principales promotores tempranos A2b, A2c y C2 que poseen unas cajas -10 y -35 muy similares a las consenso de reconocimiento por el factor sigma constitutivo σ^A , el promotor A3 carece de caja -35 por lo que necesita el producto del gen *4*, es decir, la proteína p4, para su activación (explicado con detalle en el apartado 2.2.).

2.2. Regulación de la transcripción

La regulación de la transcripción del bacteriófago $\phi 29$ ha sido ampliamente estudiada (revisado en, Salas and Rojo, 1993; Rojo et al., 1998; Meijer et al., 2001a). Los promotores tempranos A2b y A2c y el promotor tardío A3 se localizan en una región intergénica situada entre el operón tardío y el operón temprano localizado en el extremo izquierdo del genoma (ver Figura 5). La transición de transcripción temprana a tardía está controlada principalmente por la proteína temprana p4. La proteína p4 es un regulador transcripcional que se une al DNA reconociendo una secuencia rica en AT flanqueada por una G a cada lado con las cuales interacciona directamente (Barthelemy and Salas, 1989; Nuez et al., 1994; Pérez-Lago et al., 2005a). La proteína p4, cuya estructura unida al DNA ha sido resuelta recientemente (Badía et al., 2006), es un dímero en solución y se une al DNA contactando sólo una cara de la doble

hélice (Rojo and Salas, 1991). La región intergénica de los promotores A2c, A2b y A3 contiene 4 sitios de unión de p4 denominados sitio 1, 2, 3 y 4 (Camacho and Salas, 2004). La región central del denominado sitio 3 se localiza en la posición -82 respecto a la posición de inicio de la transcripción del promotor tardío A3 (Barthelemy and Salas, 1989). Este promotor carece de caja -35 necesaria para poder ser reconocido por la σ^A -RNAP por lo que necesita la proteína p4 para activar su transcripción. Así, la proteína p4 unida al sitio 3 es capaz de estabilizar el complejo cerrado de transcripción de la RNAP en el promotor tardío A3 (Nuez et al., 1992) a través de contactos que implican el residuo Arg¹²⁰ de p4 y el dominio C-terminal de la subunidad α (α CTD) de la RNAP (Mencía et al., 1993; Mencía et al., 1996). Además, este sitio 3 de unión de p4 solapa parcialmente con la secuencia del promotor temprano A2b. La unión de p4 a este sitio ocupa la caja -35 del promotor A2b impidiendo por tanto la unión de la σ^A -RNAP y reprimiendo así su transcripción (Rojo and Salas, 1991). Por tanto, la unión de p4 al sitio 3 reprime por un lado la expresión del promotor temprano A2b y por otro activa el promotor tardío A3. La unión de p4 a este sitio de unión aumenta la curvatura intrínseca de esta región que favorece la represión del promotor temprano A2b ya que dificulta la unión de la RNAP al promotor (Rojo and Salas, 1991).

El sitio 2 de unión de p4 está localizado en la posición -72 respecto al inicio de la transcripción del promotor A2c. La unión de p4 a este sitio sobreestabiliza la unión de la σ^A -RNAP al promotor A2c provocando que la RNAP sea incapaz de escapar del promotor aunque es capaz de dar lugar a ciclos de transcripción abortiva (Monsalve et al., 1996a; Monsalve et al., 1997). En este mecanismo de inhibición están implicados los mismos contactos entre p4 y la α CTD que intervienen en la activación del promotor A3 (Monsalve et al., 1996a; Monsalve et al., 1996b).

Además de p4, la proteína p6 participa en el cambio de transcripción temprana a tardía (Elías-Arnanz and Salas, 1999; Camacho and Salas, 2001a; Calles et al., 2002; Camacho and Salas, 2004). Esta proteína, que es un dímero en solución (Abril et al., 1997), interacciona con el DNA de doble banda (Prieto et al., 1988; Serrano et al., 1990; Freire et al., 1994) reconociendo aspectos estructurales más que secuencias específicas. Las proteínas p4 y p6 se unen de forma cooperativa al DNA formando un complejo nucleoproteico con p4 unida a los sitios 1 y 3 y p6 unida a la región intermedia. Como consecuencia, se produce la represión de los promotores tempranos A2b y A2c y la activación del promotor tardío A3 (Elías-Arnanz and Salas, 1999).

La proteína p6 tiene gran afinidad por los extremos del genoma de ϕ 29 a los cuales se une actuando como proteína iniciadora de la replicación (explicado en detalle en el apartado 2.3.). La unión de p6 al extremo derecho impide la unión de la RNAP al promotor C2 por lo que

esta proteína actúa también como un represor transcripcional del promotor temprano C2 (Whiteley et al., 1986; Barthelemy et al., 1989; Camacho and Salas, 2001b).

2.3 Replicación del DNA

El genoma del fago $\phi 29$ es una molécula lineal de DNA de banda doble (Paces et al., 1986) con una TP unida de forma covalente a los extremos 5'. La proteína p6 reconoce los extremos del DNA y se une a ellos formando un complejo nucleoproteico que estimula la iniciación de la replicación probablemente ayudando a la apertura de la doble hélice del DNA (Figura 6, Blanco et al., 1986; Serrano et al., 1994). La replicación requiere la formación previa de un heterodímero entre la DNAP y una molécula de TP libre (Blanco et al., 1987). La replicación comienza con el reconocimiento por parte del heterodímero de los orígenes de replicación, que presentan una secuencia repetida de 6 pb (5'-AAAGTA-3') (Salas, 1991), facilitando la formación de un enlace covalente entre el primer nucleótido y la TP presente en el heterodímero. La DNAP cataliza la adición de una molécula de dAMP al grupo hidroxilo de la Ser²³² de la TP (Blanco and Salas, 1984; Hermoso et al., 1985), empleando como molde el segundo dTMP de la secuencia del DNA (Méndez et al., 1992). A continuación, para recuperar la primera posición de la cadena y gracias a la reiteración de secuencia en los extremos del genoma, el complejo se desliza una posición hacia atrás (*sliding-back*), quedando el primer nucleótido insertado enfrente a la primera posición (dTMP) del genoma (Méndez et al., 1992). Una vez incorporado el primer nucleótido, esta misma DNAP lleva a cabo la elongación de la replicación (Blanco and Salas, 1985). A partir de la incorporación del sexto dNMP, la DNAP y la TP experimentan un cambio conformacional, etapa conocida como transición (Méndez et al., 1997), que desencadena la disociación del heterodímero a partir de la posición del décimo dNMP, quedando la TP unida de forma covalente al extremo 5' de la cadena naciente de DNA. Esto genera lo que se conoce como intermediarios de replicación de tipo I que consisten en moléculas de DNA de doble cadena (dsDNA) con una o varias cadenas de DNA de banda simple (ssDNA) de diferentes tamaños. Estas cadenas de banda sencilla son recubiertas por la proteína viral p5 que evita por un lado la acción de nucleasas (Martín et al., 1989) y por otro la formación de estructuras secundarias (Soengas et al., 1995). A partir de este momento, la DNAP lleva a cabo la síntesis completa de la molécula de DNA de manera procesiva acoplada al desplazamiento de la cadena que no está siendo utilizada como molde (Blanco et al., 1989). Como la replicación comienza en ambos extremos del genoma, cuando las dos horquillas de replicación se encuentran, se produce la separación de las dos cadenas parentales parcialmente replicadas dando lugar a la formación de dos intermediarios de replicación de tipo II. Cada uno de ellos consiste en una molécula de DNA completa que desde

un extremo es de doble cadena y desde el otro de cadena sencilla (Inciarte et al., 1980; Gutiérrez et al., 1991). Finalmente, la DNAP continúa la elongación y se completa la síntesis del DNA.

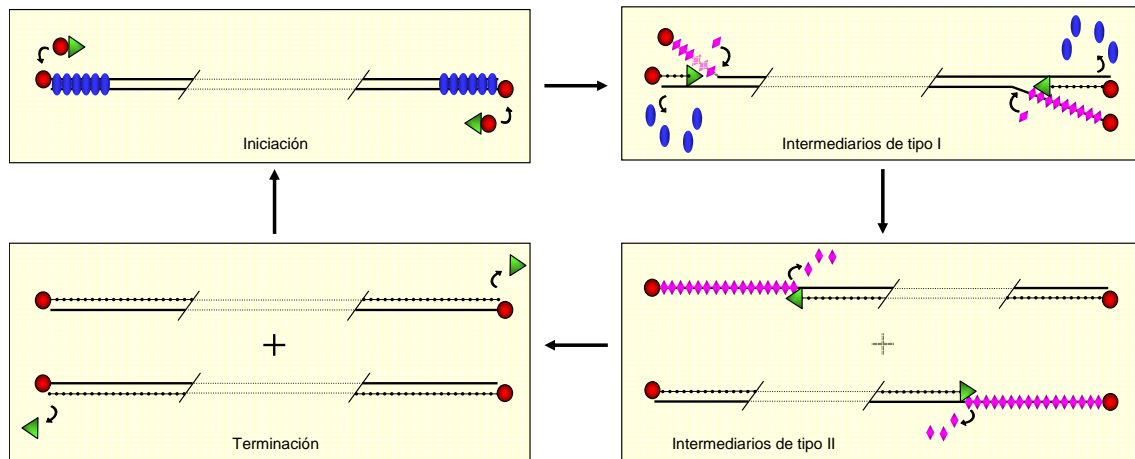


Figura 6. Representación esquemática de la replicación *in vitro* del DNA de $\phi 29$. La replicación comienza con el reconocimiento del complejo nucleoproteico p6 (azul)-DNA por el heterodímero TP (rojo)-DNAP (verde). A continuación la DNAP cataliza la adición del primer dATP a la TP presente en el heterodímero. Después de la etapa de transición (no mostrada), se disocia el heterodímero TP-DNAP y la DNAP completa la replicación. La replicación está acoplada al desplazamiento de banda. La p5 (rosa) se une al ssDNA durante la generación de los intermediarios de replicación de tipo I y posteriormente es desplazada por la DNAP, en la generación de los intermediarios de replicación de tipo II. La cadena de DNA de nueva síntesis está representada mediante una línea punteada.

Otros factores virales importantes para la replicación *in vivo* son las proteínas p1, p16.7 y p17. Se sabe que p1 y p16.7 se encuentran unidas a la membrana de la bacteria y que son capaces de interactuar con la TP. Además, la proteína p16.7 interacciona con el DNA de forma inespecífica. Esto sugiere que ambas proteínas están involucradas en la asociación de la replicación del DNA del bacteriófago a la membrana bacteriana (Bravo and Salas, 1997; Bravo et al., 2000; Meijer et al., 2001b; Albert et al., 2005). Aunque no se conoce exactamente su papel en la replicación, se ha descrito que la proteína p17 favorece la unión de p6 al DNA (Crucitti et al., 2003).

2.4. Desarrollo del bacteriófago $\phi 29$ a lo largo del crecimiento de *B. subtilis*

Los bacteriófagos han desarrollado una gran variedad de estrategias de infección (Calendar, 2006) que les permiten o mantenerse en un estado de lisogenia durante muchas generaciones o desarrollar su ciclo de infección en un corto periodo de tiempo. Se considera que los virus han co-evolucionado con sus huéspedes por lo que han desarrollado estrategias para adaptarse a los distintos estadios de diferenciación de los mismos. Un ejemplo ilustrativo es el

de algunos bacteriófagos que infectan *B. subtilis*. Cuando estos fagos infectan células que se encuentran en las etapas iniciales del proceso de esporulación no provocan la lisis de la bacteria, sino que el genoma del fago permanece inactivo y es atrapado en el interior de la pre-espora lo que genera una estrategia de infección alternativa (Sonenshein, 1970). Una vez que las condiciones ambientales son favorables de nuevo para el desarrollo de la bacteria, la espora germina y es entonces cuando el fago inicia su ciclo lítico. $\phi 29$ es considerado un virus lítico, es decir, una vez que infecta una célula diana lleva a cabo su ciclo infectivo que da como resultado la lisis de la célula infectada y la liberación al medio de nuevas partículas del fago. Sin embargo, $\phi 29$ es uno de los bacteriófagos que desarrollan la estrategia de infección alternativa (Moreno, 1979). Esta estrategia de infección alternativa requiere por un lado la supresión del desarrollo del ciclo lítico del fago y por otro lado un mecanismo que se encargue de la segregación del genoma del fago al interior de la pre-espora. Kawamura e Ito (1974) describieron que tanto la transcripción como la replicación de $\phi 29$ están reprimidas cuando el fago infecta células que están iniciando la esporulación. Sin embargo, nada se sabe de los mecanismos moleculares que llevan a cabo estos procesos ni sobre el mecanismo molecular de inserción del genoma del fago en la pre-espora.

Objetivos

Aunque $\phi 29$ es considerado un fago lítico, trabajos realizados en los años 70 muestran que cuando el fago infecta células que se encuentran en los primeros estadios de la esporulación, desarrolla una estrategia de infección alternativa que desencadena la incorporación del genoma del fago a la pre-espora. Esta estrategia garantiza la supervivencia del fago en una de las estructuras biológicas más resistentes de la naturaleza hasta que las condiciones sean las idóneas para la germinación de la espora y para la producción de gran cantidad de progenie viral. Nada se sabe sobre los mecanismos moleculares involucrados en la estrategia de infección alternativa por lo que los objetivos planteados en esta tesis fueron:

1. Determinar el mecanismo molecular por el cual el genoma del fago es incorporado en el interior de la pre-espora.
2. Estudiar los factores implicados en la supresión del desarrollo del ciclo lítico de $\phi 29$ en las primeras etapas de la esporulación.
3. Profundizar en el estudio de los efectos de Spo0A sobre el desarrollo del fago en etapas de crecimiento anteriores a la esporulación.
4. Analizar si la estrategia de infección alternativa de $\phi 29$ está conservada en fagos relacionados, en concreto en el bacteriófago Nf perteneciente al grupo 2.
5. Estudiar el posible papel de Spo0A en la inhibición de la replicación del cromosoma de *B. subtilis* necesaria para un eficaz desarrollo de la esporulación.

Materialles y Métodos

1. Materiales

Enzimas y proteínas

Las enzimas de restricción, la T4 polinucleótido quinasa, la T4 DNA ligasa, la seroalbúmina bovina (BSA), el fragmento Klenow (3'→5' exo⁻) de la DNAP I y la Vent DNA polimerasa, procedían de New England Biolabs (NEB). La fosfatasa alcalina, el inhibidor de RNasa “Rnasin” y la transcriptasa inversa AMV se compraron a Promega y la polimerasa Pfu turbo a Stratagene.

Las proteínas p4 y p6 de ϕ 29 se purificaron como se describe en Barthelemy et al., (1987) y Pastrana et al., (1985), respectivamente. Las proteínas p4 y p6 de Nf se obtuvieron como se describe en Pérez-Lago et al., (2005b). La RNAP de *B. subtilis* se obtuvo según el protocolo descrito en Sogo et al., (1979). La $\alpha\Delta$ 15RNAP se preparó según el protocolo descrito en Mencía et al., (1996).

Se utilizó el kit *Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I* de Roche para los ensayos de PCR a tiempo real.

La escalera de DNA utilizada para determinar los tamaños de los fragmentos de DNA en los ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I y en los ensayos de transcripción *in vitro* se generó mediante el kit *Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing* de USB.

Medios de cultivo utilizados

La mayoría de los cultivos se crecieron en medio LB (preparado según el protocolo descrito en Sambrook et al., (1989)). En los ensayos realizados en condiciones de esporulación se utilizó o medio Schaeffer (medio rico de esporulación) (Schaeffer et al., 1965) o medio SM (*sporulation medium*) o medio CH (medio mínimo suplementado con un hidrolizado de caseína).

El método de resuspensión utilizado para inducir la esporulación consiste en crecer las células en medio CH hasta una OD₆₀₀ de ~0,7, centrifugarlas y resuspenderlas en medio SM.

Tabla MM1. Estirpes bacterianas utilizadas

Estirpe	Genotipo relevante	Fuente o referencia
<i>B. subtilis</i>		
168	<i>trpC2</i>	BGSC ^a
110NA	<i>trpC2, spo0A3</i>	(Moreno et al., 1974)
SWV215	<i>trpC2, pheA1, spo0A::km</i>	Colección del laboratorio
AG1505	JH642, $\Delta(\text{soj-spo0J})::\text{spc}$	(Ireton et al., 1994)
WM90	168, $\Delta\text{spo0A}::\text{Km}$	Esta tesis
WM100	168, $\Delta(\text{soj-spo0J})::\text{spc}$	Esta tesis
M1_C2A	<i>trpC, amyE::[C2+ las cajas 0A-5 y 0A-6 localizadas upstream J-lacZ]</i>	Esta tesis
M1_A2bc	<i>trpC, amyE::[region de los promotores A2b-A2c con las cajas 0A-1, 0A-2 y 0A-3 J-lacZ]</i>	Esta tesis
M1_A2bA	<i>trpC, amyE::[A2b+la caja 0A-3 localizada upstream]-lacZ</i>	(Meijer and Salas, 2004)
M1_A2cA	<i>trpC, amyE::[A2c+ cajas 0A-1 y 0A-2]-lacZ</i>	(Meijer and Salas, 2004)
M0_C2A	Derivado de M1_C2A con <i>spo0A::Km</i>	Esta tesis
M0_A2bc	Derivado de M1_A2bcA con <i>spo0A::Km</i>	Esta tesis
M0_A2bA	Derivado de M1_A2bA con <i>spo0A::Km</i>	Esta tesis
M0_A2cA	Derivado de M1_A2cA con <i>spo0A::Km</i>	Esta tesis
spo0A/IIA	168, P _{spo0A-iyfp} , Cm, <i>amyE::P_{spoIIA-icfp}</i> , Km	(Veening et al., 2005)
JH642	<i>trpC2, pheA1</i>	(Perego et al., 1988)
BAL363	<i>trpC2, pheA1, $\Delta\text{kinC}::\text{spec}$</i>	Beth Lazazzera
BAL687	<i>trpC2, pheA1, kinA::Tn917ΩHU19, $\Delta\text{kinB}, \text{kapB}::\text{phleo}$</i>	Beth Lazazzera
BAL691	<i>trpC2, pheA1, kinD::pGEM-Cm</i>	(Hamon and Lazazzera, 2001)
BAL692	<i>trpC2, pheA1, kinE::pGEM-Cm</i>	(Hamon and Lazazzera, 2001)
BAL700	<i>trpC2, pheA1, $\Delta\text{kinC}::\text{spec}$, kinD::pGEM-Cm</i>	Beth Lazazzera
VCLL1	168, P _{spo0A-iyfp} , Cm, <i>amyE::P_{spoIIA-icfp}</i> , Km, $\Delta\text{kinC}::\text{spec}$	Esta tesis
<i>E. coli</i>		
BL21(DE3)	<i>Lon, ompT, λDE3 lysogen</i>	(Studier and Moffat, 1986)
AQ3519	<i>argH, deo, dnaA850::Tn10, his-29, metB, metD88, pro, rnh::cat, thyA, trpA9605</i>	(Kline et al., 1986)
XL1-Blue	F'::Tn10, <i>proA+B+</i> , <i>lacI^d</i> , $\Delta(\text{lacZ})\text{M15}$, <i>recA1, endA1, gyrA96 (Nal^r), thi, hsdR17, (r_k-m_k+), supE44</i> ,	(Bullock et al., 1987)

relA1, lac

^aBacillus Genetic Stock Center, Department of Biochemistry, The Ohio State University, Columbus, OH, USA.

Tabla MM2. Plásmidos utilizados

Nombre	Descripción	Fuente o referencia
pBSK+	Vector de clonaje en <i>E. coli</i>	(Short et al., 1988)
pET0A	Vector de sobreexpresión de Spo0A basado en pET26b(+)	(Muchová et al., 2004)
pWKM6	Vector de traducción de <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> . Basado en el plásmido pMTL25 y en el replicón mínimo del plásmido pLS20 de <i>B. subtilis</i> .	(Meijer et al., 1995)
pBox	Derivado del plásmido pBSK+ en el que se ha clonado, en el sitio <i>Bam</i> HI, un sitio <i>parS</i> de ϕ 29 (el sitio localizado en las posiciones 17246 a 17261 del genoma) y las 10 pb que lo flanquean.	(Meijer et al., 2005)
pParSa	Plásmido pBox con el fragmento de 2256 pb <i>Pst</i> I del plásmido pWKM6 que contiene el replicón mínimo del plásmido pLS20 y el gen de resistencia a kanamicina.	(Meijer et al., 2005)
pParSb	Igual que el plásmido pParSa pero con el fragmento de 2256 pb <i>Pst</i> I del plásmido pWKM6 en la orientación contraria.	(Meijer et al., 2005)
pNeg	Vector pBSK+ con el fragmento <i>Pst</i> I de 2256 pb del plásmido pWKM6 que comprende el replicón mínimo del plásmido pLS20 y la resistencia a kanamicina.	(Meijer et al., 2005)
pUC19 Ω	Plásmido pUC19 con el interposon Omega en el sitio <i>Nar</i> I.	(Monsalve et al., 1997)
pRD62	Vector de integración del gen <i>lacZ</i> y de la resistencia a cloranfenicol en el sitio <i>amyE</i> de <i>B. subtilis</i> . Contiene el posible promotor <i>yllC</i> .	(Daniel et al., 1996)
pOC2A	Derivado del plásmido pUC19 Ω que contiene, en el sitio <i>Xba</i> I, la secuencia del promotor C2 y sus 98 pb <i>upstream</i> , que comprenden las cajas 0A-5 y 0A-6.	(Meijer et al., 2005)
pOC2B	Derivado del plásmido pUC19 Ω que contiene, en el sitio <i>Xba</i> I, un fragmento del promotor C2 de ϕ 29 con las 62 pb <i>upstream</i> , que contienen únicamente la caja 0A-5.	(Meijer and Salas, 2004)
pOA3	Derivado del plásmido pUC19 Ω que contiene, en el sitio <i>Xba</i> I, un fragmento del genoma de ϕ 29 de 261 pb que comprende la región de los promotores A2c, A2b y A3 con las cajas 0A-1, 0A-2 y 0A-3.	(Meijer et al., 2005)
pOA2bc	Derivado del plásmido pUC19 Ω que contiene, en el sitio <i>Xba</i> I, un fragmento de 205 pb del genoma de ϕ 29 que comprende la región de los promotores A2b-A2c, incluyendo las cajas 0A-1, 0A-2 y 0A-3.	(Meijer et al., 2005)
pOA2bA	Derivado del plásmido pUC19 Ω que contiene, en el sitio <i>Xba</i> I, un fragmento de 142 pb del genoma de ϕ 29 que comprende la región del promotor A2b incluyendo la caja 0A-3 localizada <i>upstream</i> del promotor.	(Meijer and Salas, 2004)

pOA2cA	Derivado del plásmido pUC19 Ω que contiene, en el sitio <i>Xba</i> I, un fragmento de 94 pb del genoma de ϕ 29 que comprende la región del promotor A2c incluyendo las cajas 0A-1 y 0A-2.	(Meijer and Salas, 2004)
pDM1_C2A	Derivado del plásmido pRD62 que contiene, en el sitio <i>Eco</i> RI- <i>Bgl</i> II, un fragmento del promotor C2 con las cajas 0A-5 y 0A-6, extraído del plásmido pOC2A.	(Meijer et al., 2005)
pDM1_C2B	Derivado del plásmido pRD62 que contiene, en el sitio <i>Eco</i> RI- <i>Bgl</i> II, un fragmento de DNA de la región del promotor C2 con la caja localizada <i>upstream</i> (0A-5), extraído del plásmido pOCA.	(Meijer and Salas, 2004)
pDM1_A3	Derivado del plásmido pRD62 que contiene, en el sitio <i>Eco</i> RI- <i>Bgl</i> II, un fragmento de DNA que comprende la región de los promotores A3-A2c incluyendo las cajas 0A-1, 0A-2 y 0A-3, extraído del plásmido pOA3.	(Meijer et al., 2005)
pDM1_A2bc	Derivado del plásmido pRD62 que contiene, en el sitio <i>Eco</i> RI- <i>Bgl</i> II, un fragmento de DNA que comprende la región de los promotores A2b-A2c incluyendo las cajas 0A-1, 0A-2 y 0A-3, extraído del plásmido pOA2bcA.	(Meijer et al., 2005)
pDM1_A2bA	Derivado del plásmido pRD62 que contiene, en el sitio <i>Eco</i> RI- <i>Bgl</i> II, un fragmento de DNA que comprende la región del promotor A2b, incluyendo la caja 0A-3, extraído del plásmido pOA2bA.	(Meijer and Salas, 2004)
pDM1_A2cA	Derivado del plásmido pRD62 que contiene, en el sitio <i>Eco</i> RI- <i>Bgl</i> II, un fragmento de DNA que comprende la región del promotor A2c, incluyendo las cajas 0A-1 y 0A-2, extraído del plásmido pOA2cA.	(Meijer and Salas, 2004)
pBsdnaA1	Vector de sobreexpression de la proteína DnaA de <i>B. subtilis</i> .	(Krause et al., 1997)
pBsociC4	Derivado del plásmido pLEX5BA que contiene la region completa del <i>oriC</i> de <i>B. subtilis</i> con regiones flanqueantes.	(Krause et al., 1997)

Productos químicos y reactivos

La acrilamida (40%) y la bis-acrilamida (2%) utilizadas para preparar los geles nativos de acrilamida se compraron a SIGMA, mientras que la acrilamida 4x de secuenciación que se empleó para los geles desnaturizantes de urea y la que se utilizó para las electroforesis de proteínas con SDS se compraron a Serva. La N,N-metilendiacrilamida utilizada para los geles desnaturizantes se obtuvo de Merck. La eliminación del nucleótido no incorporado en los marcajes se realizó mediante columnas de Sephadex G-50 (SIGMA) o mediante las *mini Quick Spin DNA Columns* (Roche). La mayoría de los productos, como las sales, los ácidos, los alcoholes, la Trizina Base, la urea, el EDTA, la piperidina, etc. se compraron a SIGMA o a Merck. Para la extracción del DNA de geles de agarosa y para la purificación de los productos de las reacciones de PCR se utilizó el kit *QIAquick* de QIAGEN. El kit de purificación de plásmidos *Wizard sv miniprep* proviene de Promega. Las columnas de fosfocelulosa empleados

para la purificación de proteínas se compraron a WHATMAN y las de Heparina-Agarosa a Sigma.

Otros

Los antibióticos se compraron a SIGMA.

Los nucleótidos y deoxinucleótidos fueron suministrados por PHARMACIA BIOTECH y los marcados radiactivamente con el isótopo ^{32}P (3000 Ci/mmol), α -dATP, α -UTP y γ -ATP por AMERSHAM.

Los oligonucleótidos se obtuvieron de ISOGEN.

Tabla MM3. Oligonucleótidos utilizados

Nombre	Secuencia (5'-3') ^a	Posición
IP_C1U	GGC ATA CCA TGA TCA GGG AGG GAA ACT ACT AC	64-95
IP_C1L	GGA GGG TTA TAT CAT GAA GCG TGC AGA G	523-496
IP_C2U	GTC TCC GTC TAC AGG TGC TAT AAT GCC TTG	1022-1051
IP_C2L	TTA CAG CGG CAC AGG CTT GTT ATG ATC G	1548-1521
IP_S1U	TGA AGT CGA GGG AAG AAG CAT GTG	10327-10351
IP_S1L	AGC TTG GGT CTG CCT TTC TCT ATC	10580-10557
IP_S2U	GTC AAA GAG ACG CTC GAA AGA TGG	11596-11619
IP_S2L	CCC CGG TTA ATA CGG TGT TAC TAG G	11818-11842
IP_S3U	GCT GTT CCG ACT GAG AAG CAT TAC AC	15529-15554
IP_S3L	GCC GCC GCT ACC TGT AAC ATT TAT TG	16092-16067
IP_S4U	ACA GCA CAT GAC CCG TCA ACT AAG	17042-17065
IP_S4L	CTG TCC CAC CTG TGG AAA TCA ATC	17446-17423
IP_S5U	ATA CCA TTC GCC AAC CTC GGC GCT CTA AG	18521-18549
IP_S5L	GGG TAC AGC GAC AAC ATA CAC CAT TTC C	19279-19252
parSa	gat ccG TAT ACA GTA ATG TTT CAC GTG GAA CAA TCA AAA GAA g	17235-17271
parSb	gat ccT TCT TTT GAT TGT TCC ACG TGA AAC ATT ACT GTA TAC g	17271-17235
C2_L1	ttt ttc tag act agt aga tct GGT TGT CTT ATT ACC TTA CTT CTA TTA TAG	19104- 19133
C2_U1	ttt ttc tag aag ctt gaa ttc CCA TTT CCC CAT TGA CCG ACT ATC	19259- 19236
C2_U2	ttt ttc tag aag ctt gaa ttc CTA ACA ACT AAA TCA CGA CTA TAT ACC	19223- 19197
A3_U1	ttt ttc tag aag ctt gaa ttc CTT TCT ATA ATC TAT TAG TAC TAC	5210-5187
A2c_L1	ttt ttc tag act agt aga tct GTA GAC TCT GTA TCT CTT CTA CTC	4950-4973
A2b_L1	ttt ttc tag atc TCT ATA AAA AGT TCG ACA AAG TTT TAC AAG G	5013-5043
A2b_L2	aca agg ttt taa taa aag gtt gtt gtc tac gtt ctc t	5038-5074
A2b_U1	ttt ttc tag aag ctt gaa ttc GGA TTT GTG GGC GTT CTT GTC GAA	5154-5131
A2b_U2	ttt ttc tag aag ctt gaa ttc CGT CAA CAT TTT ATA AAA AAG TCT TGC	5127-5101
A2c_U1	ttt ttc tag aag ctt gaa ttc CCT TGT AAA ACT TTG TCG AAC TTT TT	5043-5018
A2C_U2	ttt ttc tag aat tcG TGT TGA AAA TTG TCG AAC AGG GTG ATA TAA T	5009-4978
seq1	ggg atc gcc aag ctt cat gtg	34 ^b

seq2	ggg taa cta ttg ccg atg ata agc tgt c	36 ^b
seq3	gtg ttt ttt taa agg att tga gcg tag cg	97 ^b
seq4	aag gcg att aag ttg ggt aac gcc agg g	97 ^b
seq5	tta tgg atc caa taa ggg taa cta ttg ccg atg ata agc tgt c	50 ^b
seq6	ttt ttg atc cta tct tga taa taa ggg taa cta ttg ccg atg	50 ^b
seq7	gtg ggg atc cgt gtt ttt tta aag gat ttg agc gta gcg aaa	97 ^b
seq8	tta tgg atc caa ggc gat taa gtt ggg taa cgc cag gg	97 ^b
Phi_LL	AAC CGG ATC CAT GCG ACA CAG ACG AAG CGC TAA AAC GTG GG	193-162
Phi_LR	GTG TGG ATC CTC CTA TGA TTG GTT GTC TTA TTA CCT TAC TTC	19091-19125
Phi_left	AAA GTA AGC CCC CAC CCT CAC ATG ATA CCA TTC TCC	1-36
Phi_right	AAA GTA GGG TAC AGC GAC AAC ATA CAC CAT TTC CCC	19285-19250
AaUp_U	GCA ACC ATA ATA GGA TCC CAT ACC TTT TCA ACT TTC GAA ACC	103-127
AaUP_L	AAT AGA ATT CCC ATC TTC CGG CAC GTC CCT CCT TTT CTT AGA AAA TGG CGT C	615-574
AaDOWN_U	AAA AGG ATC CCT GCT GGC AGA TGA TGA ACA GCT TCA GCA GCA TGT	1890-1924
AaDOWN_L	CTT TTT GAA TTC GTG AAT TTC ATT TTT ATC CTC CTA ACG GAT AAT GT	2153-2117
AaUP_U2	TGT GGG ATC CAT TGC AAG CTC TCG TTT ATT TTG GTA TTA TAT TTG TG	321-359
AaUP_L2	GGT ATA ATT CGT AAT CAA GAG TTA AAA CAC AAA TAT AAT ACC AAA ATA AAC GAG AGC	376-336
OriC_ATrr _Up	CTT TTC GGA AGT CAT ACA CAG TCT GTC C	1988-1015
OriC_ATrr Down	GAA TGG GAA TCG TGG TTC TGG ATG AAA C	2228-2201
Nf_RU_XbaI	ttt ttt cta gaa ttc AAA GTA AGG TTC AAA GCA AAA TCG ACC CAT TTC CC	18754-18728
Nf_150UpOriR	CCT CTT TGA TTG TAA GTT GAT AGT TGT TC	
WF_2	GGA AAA TAT GAG AAA GAT GAT GCA ACG TGA AGT GAC GTA C	4550-4589
WF_5	GAA TTC TAT TAC TAT TTT ATT ATA TCA CGG AAA CCC TTG G	4868-4835
Nf_A2bL2	TTA AAA GAT TGT TGT GCG TTT CCT TGC TA	4711-4739
Nf_+50A3Up	TTA TGG ATC CTA GTA TAT CTT CAT GAA AAT CTC GT	4930-4906
Nf_Right_L	AAA GTA AGG TTC AAA GCA AAA TCG ACC CAT TTC CCC	18754-18719
Nf_Up_200OriR	CAC TGT TAT TGT GTG TAG TTT AGC TGA TG	18507-18535
Nf_Left_Up	AAA GTA AGC CCC CAC CCA CTT TTG ACA TAC	1-30
Nf_LL2	ACT AGA GGT TAC AGA TTT GAC CGC TTC G	378-351

^a Los nucleótidos idénticos a los de la secuencia de DNA de $\phi 29$, de Nf o del cromosoma de *B. subtilis* están en letras mayúsculas. Las letras minúsculas de los oligonucleótidos de la serie seq corresponden a extensiones en dirección 5' que contiene los sitios de restricción utilizados en los clonajes. Los oligonucleótidos de la serie seq se han utilizado en reacciones de PCR para generar sustratos que se han usado en los ensayos de transcripción *in vitro* o en ensayos de protección del DNA al tratamiento con DNasa I.

^b Los números indican las posiciones del extremo 5' con respecto a los sitios de clonaje presentes en la serie de vectores de integración pDM-1 al sitio *EcoRI* localizado *upstream* (seq2, seq3, seq6 and seq7) y el sitios *BglIII downstream* (seq1, seq4 and seq8).

Las posiciones corresponden a las posiciones en los genomas de $\phi 29$ o Nf respecto del origen izquierdo, o a las posiciones en el *oriC* de *B. subtilis* según Moriya et al., (1992).

2. Métodos

Condiciones de crecimiento de las distintas estirpes utilizadas

Por norma general, cultivos crecidos durante la noche con el antibiótico apropiado se diluyeron al menos 100 veces en el medio correspondiente sin antibiótico, precalentado. Los cultivos se crecieron a 37°C con agitación continua y el crecimiento de las células se siguió midiendo OD₆₀₀ en un espectrofotómetro (HITACHI). En los ensayos de infección, a los tiempos y condiciones indicadas para cada ensayo, se infectó con el correspondiente fago y se siguió la lisis midiendo OD₆₀₀ cada 15 min. En este tipo de ensayos, se obtuvieron resultados similares diluyendo los cultivos crecidos durante la noche al menos 100 veces, o inoculando los cultivos con una única colonia de una placa crecida durante la noche, o manteniendo las células en fase logarítmica de forma prolongada mediante la dilución del cultivo varias veces antes de alcanzar la fase estacionaria.

Construcción de los plásmidos usados en los ensayos de incorporación en las esporas

Se hibridaron los oligonucleótidos parSa y parSb, que contienen la secuencia de un sitio *parS* del genoma de ϕ 29 (posiciones de la 17246 a la 17261) generando un fragmento de DNA de 40 pb con extremos protuberantes en 5' (GATC). A continuación, se ligó el fragmento en el sitio *Bam*HI del plásmido pBSK+ y se transformaron células de *E. coli* XL1-Blue con la mezcla de ligación. Se secuenció el plásmido para comprobar que la inserción del fragmento era correcta y se le denominó pBox. Después, se clonó en el sitio *Pst*I de pBox el fragmento *Pst*I de 1,26 kb del plásmido de bajo número de copias de *B. subtilis* pLS20. El fragmento clonado contiene el replicón mínimo y la resistencia a kanamicina del plásmido (Meijer, 1995). Esto generó los plásmidos pParSa y pParSb, que contienen el fragmento clonado, y el plásmido pNeg (control negativo).

Construcción de las fusiones transcripcionales con *lacZ* e integración en el cromosoma

Se amplificaron mediante PCR usando como molde el DNA de ϕ 29 y los oligonucleótidos apropiados los fragmentos que contienen la región intergénica de los promotores A2c, A2b y A3, o las regiones que contienen los promotores A2c, A2b y C2 en presencia o ausencia de las correspondientes (semi)cajas 0A. Todos los oligonucleótidos utilizados contienen un sitio *Xba*I cerca del extremo 5' que fue utilizado para clonar los

fragmentos. Además, los oligonucleótidos que corresponden a regiones *upstream* de los promotores (denominados “U”) o *downstream* de los promotores (denominados “L”) contienen sitios *EcoRI* o *BglIII*, respectivamente, localizados en dirección 3’ respecto del sitio *XbaI*. Después de purificar los fragmentos resultantes de las reacciones de PCR, se digirieron con *XbaI* y se ligaron al sitio *XbaI* del plásmido pUC19 Ω (Monsalve et al., 1997). A continuación, se transformaron células de *E. coli* XL1-Blue con la mezcla de ligación. Después, se extrajo el fragmento *EcoRI-BglIII* de los plásmidos, que contiene las regiones de los promotores de ϕ 29, y se reemplazaron por el fragmento *EcoRI-BglIII* del vector de integración pRD62. Este vector contiene el gen *lacZ* y un fragmento del promotor *yllC* de *B. subtilis* (Daniel et al., 1996). Cada fusión con *lacZ* contiene las regiones del genoma de ϕ 29 correspondientes y, como mínimo, 19 pb *upstream* del sitio de iniciación de la transcripción. El plásmido pRD62 es un derivado del plásmido pBR322 de *E. coli* y contiene secuencias correspondientes a las regiones N- y C-terminales del gen *amyE* de *B. subtilis*, separadas por los genes *cat* y *lacZ* orientados de forma divergente. Los plásmidos de integración resultantes están indicados en la Tabla MM2 (serie pDM1-). Estos plásmidos de integración se transformaron en la estirpe 168 de *B. subtilis* y se seleccionaron por resistencia a cloranfenicol. Para confirmar que había tenido lugar la inserción a través de un entrecruzamiento doble, se analizó la pérdida de actividad amilasa. A continuación, se construyó una estirpe isogénica delecionada en el gen *spo0A* para cada una de las estirpes generadas.

Ensayo de entrecruzamiento de DNA unido a proteínas, inmunoprecipitación y PCR a tiempo real

El entrecruzamiento, la inmunoprecipitación y la PCR a tiempo real se llevó a cabo básicamente como se describe en González-Huici et al., (2004), realizando las siguientes modificaciones. Las células, crecidas a 37°C hasta una densidad aproximada de 10^8 células por ml, se infectaron con ϕ 29 a una m.o.i. de 10 y se trataron con paraformaldehído 20 min después de la infección para entrecruzar las proteínas y el DNA. Después del entrecruzamiento, de lisar las células, de romper el DNA mediante sonicación en fragmentos de un tamaño aproximado de 750 pb y de un paso de centrifugación, 1/20 de cada muestra se guardó para el análisis de la cantidad total de DNA. El resto se utilizó para la inmunoprecipitación con anticuerpos policlonales anti-Spo0J. El análisis del DNA de las muestras se realizó mediante PCR a tiempo real (usando los oligonucleótidos de la serie IP descritos en la Tabla MM3). Los valores de DNA total y DNA inmunoprecipitado para cada una de las muestras se interpoló en una curva patrón generada mediante cantidades conocidas de DNA total de ϕ 29 purificado. Los valores obtenidos se expresaron como pg de DNA inmunoprecipitado por ml de cultivo. Los valores de

unión de Spo0J a las distintas regiones se expresaron mediante el valor de IC, que representa la cantidad de DNA inmunoprecipitada en función del DNA total, multiplicado por 10^6 . La especificidad de los oligonucleótidos utilizados se comprobó en reacciones de PCR utilizando como molde el genoma completo de $\phi 29$. Además, se realizó un análisis de *melting* al final de cada una de las reacciones de PCR a tiempo real midiendo de forma continua la emisión de fluorescencia en el rango de temperatura de 65 a 95°C, comprobando así la obtención de un único producto amplificado.

Ensayos de incorporación del genoma de $\phi 29$ o de un plásmido en las esporas

El método seguido está basado en el protocolo de resuspensión de células para sincronizar la entrada en esporulación (Partridge and Errington, 1993). Así, para los dos ensayos, se crecieron cultivos a 37°C en un medio de cultivo que contenía un hidrolizado de caseína, medio CH (complementado con kanamicina en el caso del ensayo con el plásmido, y con 5 mM MgSO₄ en el caso del genoma de $\phi 29$) hasta una OD₆₀₀ de 0,7. En este momento, se centrifugaron las células y se resuspendieron en medio SM, previamente calentado a 37°C. En el caso de la inserción del plásmido, se incubaron las células durante 9 h más a 37°C. Después, alícuotas del cultivo se calentaron a 80°C durante 15 min para matar las células que no hubiesen completado el proceso de esporulación. A continuación, diluciones apropiadas de las muestras se plaquearon sobre placas de LB sin antibiótico. Finalmente, se transfirieron 200 colonias a placas de LB con kanamicina y de ellas se obtuvo el porcentaje de esporas que contenían el plásmido.

Para el ensayo de la medida de la inserción del genoma de $\phi 29$ en la espora, se infectaron las células con $\phi 29$ y se procesaron a diferentes tiempos después de la infección (20, 30, 40 o 50 min), siguiendo básicamente el protocolo descrito en Moreno (1979). Tras el tratamiento de las esporas con lisozima y con calor (15 min a 80°C), se lavaron cinco veces con agua estéril. Después, se resuspendieron en PBS con una dilución 1/50 de un antisuero anti- $\phi 29$ (previamente se determinó que una dilución 1/50 del anti-suero neutralizaba más de un 99,9% de las partículas virales) y se incubó 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se resuspendieron las esporas en agua estéril. Una parte de las esporas se mezclaron con células de la estirpe 110NA de *B. subtilis* y se utilizaron para determinar el número de esporas que contenían el genoma de $\phi 29$, a través de la cuantificación de las placas de lisis producidas. La otra parte de las esporas, se diluyó apropiadamente, y se plaquearon sobre placas de LB y se utilizaron para determinar el número de esporas que no contenían el genoma del fago. Como control del experimento, se analizaron las placas producidas al plaquear el sobrenadante

resultante de la centrifugación de las esporas y dio un valor menor de 0,01% con respecto al número de placas producidas al plaquear directamente la solución de esporas.

Ensayos de formación de placas de lisis

Se crecieron cultivos de las estirpes 168 y 168:: $\Delta spo0A$ de *B. subtilis* hasta un valor de OD₆₀₀ de 0,4. A continuación, se mezclaron 0,5 ml de los cultivos con una dilución apropiada del stock del fago (en 50 mM Tris-HCl (pH7,5), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) y 2,5 ml de LB top-agar líquido (0,7% de agar) a una temperatura de 50°C. Rápidamente, se extendió la mezcla sobre placas de 1,5% de agar. Las placas se incubaron a 37°C durante 14 h.

Análisis de la producción de transcritos de $\phi 29$ *in vivo* en función del estado de crecimiento de la célula infectada

Se utilizó el ensayo de resuspensión para inducir la entrada sincronizada en esporulación. Así, después de resuspender las células en medio SM suplementado con 5 mM de MgCl₂, se dividió el cultivo en 4 alícuotas y se incubaron a 37°C. Una de las alícuotas se infectó con $\phi 29$ nada más resuspenderla en medio SM. Las otras tres alícuotas se infectaron 15, 30 y 45 min después de haberlas resuspendido en medio SM. 25 min después de la infección, se recolectaron las células y se procesaron para obtener el RNA total. Después, se procedió al análisis de los transcritos virales producidos mediante la extensión de un cebador (Monsalve et al., 1995) y los cDNAs resultantes se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 6%. Se realizó una cuantificación densitométrica de las bandas obtenidas en tres experimentos independientes. Se obtuvo, así, el valor de abundancia media relativa de los transcritos a los diferentes tiempos que se normalizaron en función de los valores de t=0.

Ensayos de producción de β -galactosidasa

Las estirpes de *B. subtilis* que contenían las fusiones de los distintos promotores de $\phi 29$ con *lacZ* se crecieron en medio Schaeffer y se fueron recogiendo alícuotas cada 45 min. Los niveles de β -galactosidasa se determinaron como se describe en Daniel et al., (1996).

Ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I

El DNA utilizado como sustrato en los ensayos de las Figuras 11, 14, 15, 16 y 17 se obtuvo mediante amplificación por PCR y digestión con la correspondiente enzima de restricción. A continuación, se rellenó el extremo protuberante mediante la enzima Klenow, incorporando en la reacción $[\alpha\text{-P}^{32}]$ dATP. El nucleótido no incorporado se eliminó pasando las reacciones por columnas de Sephadex G-50 o por *mini Spin DNA columns*.

El resto de los moldes utilizados en los ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I se obtuvieron mediante PCR en la cual uno de los oligonucleótidos estaba marcado con $[\gamma\text{-P}^{32}]$ ATP mediante la enzima T4 polinucleótido quinasa. A continuación, se purificó el producto amplificado mediante electroforesis en geles de agarosa y posterior extracción del DNA con el *kit de extracción de gel de QIAquick*. En el pie de figura de cada uno de estos ensayos se indica la cadena marcada y los oligonucleótidos y el molde utilizados para obtener el fragmento mediante PCR.

Las reacciones de protección del DNA a la digestión con DNasa I (Galas and Schmitz, 1978), se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μl que contenía, el DNA marcado en uno de sus extremos (30000 c.p.m.), 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl_2 y 1 μg de p[dI-dC]. Las mezclas se incubaron durante 10 min a 37°C con Spo0A. En los ensayos en los que se incubaba con más de una proteína, tras la incubación con Spo0A, se añadieron el resto de proteínas y se incubaron las muestras 10 min más a 37°C. Se inició la digestión del DNA con 66 ng de DNasa I. Tras dos minutos de incubación a 37°C, se paró la reacción con 2 μl de EDTA (20 mM final) y se precipitó el DNA con etanol. Los fragmentos resultantes se analizaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6%. El tamaño de las bandas se determinó llevando en paralelo, en todos los experimentos, una escalera de DNA generada mediante una reacción de secuenciación utilizando el plásmido M13 “primado” como molde y la enzima sequenasa.

Ensayos de transcripción *in vitro* tipo “run-off”

De forma rutinaria, los fragmentos utilizados como moldes en los ensayos de transcripción *in vitro* se obtuvieron por PCR amplificando las distintas regiones de interés.

Las reacciones de transcripción se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μl que contenía, 5 nM del molde de DNA, 200 μM ATP, GTP y CTP, 50 μM UTP, 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, 1 μg de p[dI-dC], 2 mM de ditioneitol (DTT), 10 U de RNasin, 0,2 μg de BSA y 10 μCi $[\alpha\text{-P}^{32}]$ UTP.

En el ensayo del promotor A3, primero se incubó el DNA 10 min a 37°C con Spo0A a las concentraciones indicadas para cada reacción. A continuación, se disparó la reacción

añadiendo 125 ng (10 nM) de RNAP de *B. subtilis* o la misma cantidad de la misma RNAP junto con 700 ng de la proteína p4. En el resto de ensayos, se incubaron primero las reacciones con las cantidades indicadas de Spo0A 10 min a 37°C y después se disparó la reacción añadiendo la RNAP de *B. subtilis*, incubando las reacciones 10 min más a 37°C. Se pararon las reacciones con 50 µl de una solución que contenía 2% de SDS y 100 mM de EDTA. Los ribonucleótidos no incorporados fueron eliminados pasando las muestras por una columna de Sephadex G-50. El RNA se precipitó con etanol y los transcritos fueron analizados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6%.

Ensayos de transcripción *in vitro* para la detección de transcritos abortivos

Las reacciones contenían, en 25 µl de volumen final, 5 nM del fragmento de DNA molde, 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 2 mM DTT, 10 U RNasin y 500 ng de *B. subtilis* RNAP. Después de 10 min de incubación a 37°C, se añadió Spo0A a las concentraciones indicadas. Tras 10 min de incubación a 37°C, se disparó la reacción añadiendo 200 µM de GTP, CTP, y UTP, y 2,5 µCi de [α -P³²] ATP. Después de 30 min de incubación a 37°C, se separaron 10 µl de la muestra, y el resto se paró con 5 µl de buffer 96% formamida, 0,05% azul de bromofenol y 0,05% xylene cyanol. Se calentaron las muestras 2 min a 72°C e inmediatamente se cargaron en un gel deanaturalizante de poliacrilamida al 20%.

Los 10 µl de muestra separados se usaron para determinar el tamaño del fragmento de *run-off* en un gel del 6%. Se paró la reacción y se procesó el RNA como en los ensayos de transcripción *in vitro*.

Ensayos de sensibilidad al tratamiento con KMnO₄

Las mezclas de reacción se prepararon como en los ensayos de protección a la digestión con DNasa I, pero en un volumen final de 25 µl. Primero, se añadieron las cantidades de Spo0A indicadas y tras una incubación de 10 min a 37°C se añadió la RNAP. Se incubó otros 10 min a 37°C, se añadió KMnO₄ a una concentración final de 4 mM y se continuó la incubación durante 30 segundos más. Después, se pararon las reacciones con 5 µl de una solución que contenía 1 M β -mercaptoetanol y 1,5 M de acetato sódico. A continuación, se utilizó una columna de Sephadex G-50 para eliminar los reactivos. El DNA se trató con piperidina 30 min a 90°C, se precipitó con etanol y se analizó en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6%.

Medida de la replicación del DNA de ϕ 29 y Nf mediante PCR cuantitativa

Las células se crecieron e infectaron con el fago correspondiente según las condiciones indicadas en el pie de figura de cada uno de los ensayos. A los tiempos posteriores a la infección indicados, se tomó 1 ml de cultivo de cada una de las muestras, se procesaron y se analizó la cantidad de DNA viral producido mediante PCR a tiempo real. Los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR de los ensayos de la Figura 20 fueron Phi_LL y Phi_left. Para los ensayos de las Figuras 26 y 30 se utilizaron las parejas de oligonucleótidos A2cL1-A23U1 y Nf_A2bL2-Nf_+50A3Up para ϕ 29 y Nf, respectivamente (características indicadas en la Tabla MM3). Los valores de DNA viral obtenidos para las distintas muestras se interpolaron en una curva patrón generada mediante cantidades conocidas de DNA total de ϕ 29 purificado. Los valores obtenidos se expresaron como ng de DNA por ml de cultivo.

Ensayo de amplificación de ϕ 29 TP-DNA

Las mezclas de reacción contenían, en 10 μ l, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 20 mM sulfato amónico, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0,1 mg/ml de BSA, 80 μ M de cada uno de los cuatro dNTPs, 1 μ Ci de [α -P³²]dATP, 5 ng de ϕ 29 TP-DNA, 5 ng de DNAP, 8 μ g de p5 (SSB) y 10 μ g de p6 (DBP). Después de incubar las reacciones 45 min a 30°C, se pararon con 10 mM EDTA-0,1% SDS. A continuación, se filtraron las muestras con columnas de Sephadex G-50. La actividad relativa se calculó a partir de la radiación Cerenkov correspondiente al volumen extraído. El análisis de los tamaños de los fragmentos de DNA sintetizados se llevó a cabo mediante la desnaturalización del DNA sintetizado con 0,7 M NaOH y posterior electroforesis y autorradiografía.

Ensayo de iniciación de la replicación (formación del complejo TP-dAMP)

Para los ensayos de iniciación de la replicación del DNA de ϕ 29, las mezclas de reacción contenían, en 25 μ l, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 20 mM sulfato amónico, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0,1 mg/ml de BSA, 0,1 μ M [α -P³²]dATP (1 μ Ci), 1,6 nM de ϕ 29 TP-DNA, 12 nM de DNAP, 12,9 nM de TP, 33,3 μ M de p6 y las cantidades indicadas de Spo0A. Las mezclas de reacción para los ensayos de iniciación de la replicación de Nf eran iguales a las de ϕ 29 salvo que contenían, 1 mM MnCl₂, 40 mM sulfato amónico, 500 ng de Nf TP-DNA, 10 ng de DNAP, 10 ng de TP y 10 μ g de p6. Las muestras de los ensayos de ϕ 29 y Nf se incubaron 5 y 10 min a 30°C, respectivamente. Se detuvieron las reacciones

añadiendo EDTA hasta una concentración de 10 mM y 0,1% de SDS. Se filtraron las muestras pasándolas por columnas de Sephadex G-50 en presencia de SDS, y los volúmenes excluidos se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Se analizó la cantidad de TP-dAMP producida mediante autorradiografía.

Ensayos de retraso en gel

Los fragmentos utilizados que contienen las distintas cajas y semicajas 0A del genoma de ϕ 29 y del DNA cromosómico de *B. subtilis* se amplificaron mediante PCR usando para cada caso el par de oligonucleótidos indicado. Los productos de las PCR se marcaron con [γ -P³²]ATP con la enzima T4 polinucleótido quinasa. Las mezclas de reacción contenían, en 20 μ l de volumen final, 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 μ g de BSA, 3000 c.p.m. del fragmento de DNA marcado, 2 μ g de p[dI-dC] y las concentraciones de Spo0A indicadas. Tras la incubación de las reacciones 15 min a 30°C, se pasaron a hielo y se les añadió 4 μ l de 30% glicerol. A continuación, se cargaron las muestras en un gel del 4% (w/v) de poliacrilamida (29:1) no desnaturalizante previamente pre-corrido. Los geles se corrieron a 4°C a 150 V, se secaron y se autorradiografiaron.

La gráfica de afinidades relativas se obtuvo densitometrando las bandas retrasadas y normalizándolas en función de la cantidad de DNA total.

Microscopía de fluorescencia

Las células se crecieron en medio Schaeffer hasta los valores de OD₆₀₀ indicados en cada caso. Se centrifugó 1 ml del cultivo y se resuspendió en 200 μ l de PBS. A continuación, se depositaron 2 μ l de las células resuspendidas en un portaobjetos el cual se había cubierto previamente con una capa de agarosa 1% en PBS, y se procedió a su visualización en el microscopio. Las imágenes se adquirieron con un sistema de microscopía compuesto por un microscopio monitorizado invertido Axiovert200 (Zeiss) equipado con una cámara EM-CDD monocroma (C9100-002) (Hamamatsu) y con una lámpara de Xenon XB0 75W/2. Todo el sistema se controla con la versión 7.3 del *software* Metamorph. Para visualizar las células, se utilizó el objetivo 100x 1.45 Plan-Fluar (Zeiss) y los filtros para amarillo (excitación 500/20 nM; emisión 542/27 nM) y azul (427/10 nM; emisión 480/40 nM) para visualizar IYFP y ICFP, respectivamente. Todas las imágenes se obtuvieron a 12 bits. Las figuras presentadas se prepararon mediante la versión 7.3 del *software* Metamorph. La cuantificación de la fluorescencia de las células individuales se realizó mediante la opción de cuantificación de regiones del *software* y se expresó mediante el uso del valor de intensidad media de

fluorescencia (valores totales de la escala de grises/número de píxeles de la región). Cada experimento se repitió al menos 3 veces y se cuantificó la fluorescencia de al menos 300 células de cada experimento.

Secuenciación del genoma de Nf

Se llevó a cabo en el servicio de secuenciación del SIDI (Servicio Interdepartamental De Investigación) mediante secuenciación por electroforesis capilar. El equipo utilizado fue ABI PRISM 3730xl, de Applied Biosystems y los marcadores eran BigDye Terminators, v 3.1 (dideoxinucleótidos terminadores de cadena).

Ensayo de sensibilidad al tratamiento con KMnO₄ de la región del *oriC* de *B. subtilis*

El ensayo se llevó a cabo básicamente como se describe en Krause et al., (1997) incluyendo las siguientes modificaciones. 1 µg del plásmido pBsoiC4 en la forma superenrollada se incubó 10 min a 37°C con las cantidades indicadas de Spo0A, en 75 µl de buffer de desenrollamiento que contiene, 25 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 10 mM acetato de magnesio, 5 mM ATP, 50 µg/ml de BSA y 100 ng de HBSu. A continuación, se añadió la proteína DnaA que había sido preincubada con ATP 1 mM, y se incubó 3 min a 37°C. Después, se añadió KMnO₄ a una concentración final de 1 mM. Tras 2 min a 37°C, se paró la reacción añadiendo 6 µl de β-mercaptoetanol y 6 µl de EDTA 500 mM. Tras una extracción con fenol/cloroformo, se filtraron las muestras en columnas de Sephadex G-50 y se digirieron con la enzima *XmnI*. Se volvieron a extraer las muestras con fenol/cloroformo, se volvieron a filtrar mediante columnas de Sephadex G-50 y se midió la cantidad de DNA presente en las muestras midiendo la absorvancia a 260 nm. A continuación, se llevó a cabo una extensión de un cebador *in vitro* utilizando como molde 250 ng de DNA de cada muestra, con los oligonucleótidos OriC_ARrr_Up (cadena temprana) u OriC_ATrr_Down (cadena tardía) marcados en el extremo 5'. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador y utilizando la Vent DNA polimerasa *exo*⁻. A continuación, se precipitaron las muestras con etanol y se sometieron a electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6%. El tamaño de las bandas se determinó llevando en paralelo en todos los experimentos una escalera de DNA generada mediante una reacción de secuenciación utilizando el plásmido M13 “primado” como molde y la enzima sequenasa. Se visualizaron los fragmentos de DNA mediante autorradiografía.

Ensayo de transcripción *in vitro* acoplado a la extensión de un cebador en el gen *dnaA* de *B. subtilis*

Primero, se realizó un análisis de transcripción *in vitro* siguiendo el protocolo anteriormente descrito, pero utilizando como molde el plásmido pBsoriC4 superenrollado. A continuación, se hibridó el oligonucleótido Aa_Up_L marcado previamente con [γ -P³²]ATP. Para ello, tras la precipitación con etanol de los productos de la transcripción, se resuspendieron en 40 μ l de un tampón que contenía, 40 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl, 2 mM DTT, 0,2 μ l de RNasin y 4 pmol del oligonucleótido mencionado marcado. Se incubaron las muestras 2 min a 80°C y se fue bajando lentamente la temperatura hasta 30°C. Se pasaron las muestras a hielo y se precipitaron con etanol. A continuación, se llevó a cabo la extensión del cebador. Para ello, se resuspendieron las muestras en 10 μ l de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 40 mM KCl, 7 mM de acetato de magnesio, 2 mM DTT, 0,2 μ M de dCTP, dGTP, dTTP y dATP, 40 U de RNasin, 0,2 μ l de [α -P³²]dATP y 4 U de la transcriptasa inversa AMV. Se incubaron 60 min a 42°C y se paró la reacción añadiendo EDTA hasta una concentración de 20 mM y Tris-HCl (pH 7,5) hasta una concentración de 10 mM. Se filtraron las muestras pasándolas por columnas de Sephadex G-50 y se precipitaron con etanol. A continuación, se cargaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6% y se visualizaron mediante autorradiografía.

3. Purificación de proteínas

Purificación de Spo0A

Se siguió el protocolo descrito por Muchová et al., (2004). Mediante filtración en gel vimos que, de forma similar a lo publicado en Ladds et al., (2003), aproximadamente un 40 % de la proteína resultante de la purificación estaba en la forma activa dimérica.

Purificación de la proteína DnaA de *B. subtilis*

Se siguió básicamente el protocolo descrito en Krause et al., (1997), con algunas modificaciones. Se sobreexpresó la proteína DnaA de *B. subtilis* en células de *E. coli* WM2300 con el plásmido pBsdnaA1, que contiene el gen *dnaA*. La estirpe WM2300 es la estirpe de *E. coli* AQ3519, que presenta una inserción de un transposón en el gen *dnaA*, lo que evita que pueda haber alguna contaminación durante la purificación con DnaA de *E. coli*. Se creció la estirpe en medio LB suplementado con ampicilina y glucosa (40 mM) durante la noche a 37°C.

Al día siguiente, se utilizó este cultivo para inocular 10 l de medio LB fresco. Se crecieron las células a 30°C y se indujeron con IPTG 0,5 mM durante 150 min 1h después de alcanzar una OD₆₀₀ de 0,6. Posteriormente, se recogieron las células por centrifugación (15 min 2000xg a 4°C), obteniéndose 31 g de bacterias.

Se añadió el doble en peso de alúmina (62 g) y se machacó en un mortero durante al menos 30 min a 4°C. Se resuspendió el machacado en 4 volúmenes (124 ml) de tampón 6 (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5% glicerol, 1 mM EDTA, 7 mM β-mercaptoetanol) suplementado con 0,8 M NaCl y se centrifugó 5 min a 3000 r.p.m a 4°C para eliminar la alúmina. Se resuspendió el precipitado en dos volúmenes de tampón 6 (0,8 M NaCl) y se volvió a centrifugar 5 min a 3000 r.p.m a 4°C. Se pasaron los sobrenadantes a nuevos tubos y se centrifugaron 25 min a 12000 r.p.m a 4°C. A continuación, se precipitó el DNA añadiendo 0,3% de polietilenimina (PEI) y centrifugando 15 min a 11000 r.p.m. a 4°C. Se precipitaron las proteínas con 70% de sulfato amónico, centrifugando 35 min a 13000 r.p.m. a 4°C. El precipitado se lavó varias veces con tampón 6 con 50% de sulfato amónico y se resuspendió en tampón 6 (0,1 M NaCl). La solución se cargó en una columna de fosfocelulosa, previamente equilibrada con tampón 6 (0,1 M NaCl). Se pasaron por la columna varios volúmenes de tampón 6 con diferentes concentraciones de NaCl y se fueron recogiendo las fracciones correspondientes. Las proteínas eluidas se analizaron en geles al 12% de poliacrilamida-SDS (Laemmli, 1970), que se tiñeron con azul de coomassie. La proteína DnaA eluyó en las fracciones de tampón 6 (0,150 M NaCl).

Purificación de la proteína HBSu de *B. subtilis*

Se purificó la proteína HBSu producida por la estirpe 110NA de *B. subtilis*. Se creció la estirpe en medio LB durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se utilizó este cultivo para inocular 30 l de medio LB fresco y se creció hasta OD₆₀₀=2. Se recogieron las células por centrifugación (15 min 2000xg a 4°C), obteniéndose 100 g de bacterias. Se utilizaron 50 g, se añadió el doble en peso de alúmina (100 g) y se machacó en un mortero durante al menos 30 min a 4°C. Se resuspendió el machacado en 4 volúmenes (225 ml) de tampón 6 (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5% glicerol, 1 mM EDTA, 7 mM β-mercaptoetanol), suplementado con 1 M NaCl y se centrifugó 5 min a 3000 r.p.m. para precipitar la alúmina. Se resuspendió el precipitado en dos volúmenes de tampón 6 y se volvió a centrifugar 5 min a 3000 r.p.m a 4°C. Se pasaron los sobrenadantes a nuevos tubos y se centrifugaron 20 min a 11000 r.p.m. a 4°C para quitar todos los residuos insolubles. A continuación, se les añadió 0,175% de polietilenimina (PEI) para precipitar el DNA y se centrifugó 20 min a 10000 r.p.m. a 4°C. Se precipitaron las proteínas con 70% de sulfato amónico, centrifugando 30 min a 12000 r.p.m. a 4°C. El precipitado se lavó varias veces con tampón 6 con 50% de sulfato amónico. Finalmente,

se resuspendió en tampón 6 (0,25 M NaCl) y la solución se cargó en una columna de fosfocelulosa, previamente equilibrada con tampón 6 (0,250 M NaCl). Se hicieron varios lavados de la columna añadiendo varios volúmenes de tampón 6 (0,350 M NaCl) y se fueron recogiendo las fracciones correspondientes. Las proteínas eluidas se analizaron en geles al 12% de poliacrilamida-SDS (Laemmli, 1970), que se tiñeron con azul de coomassie. La proteína HBsu se eluyó en las fracciones de buffer 6 (0,6 M NaCl). Se juntaron las fracciones y se diluyeron hasta una concentración de 0,3 M de NaCl. Se aplicaron las muestras en una columna de Heparina y se hicieron varios lavados con tampón 6 (0,4 M NaCl). Finalmente, se eluyó la proteína con tampón 6 (1 M NaCl).

Resultados

1. Estudio de los mecanismos moleculares responsables de la estrategia de infección alternativa del bacteriófago ϕ 29 durante la infección de células que se encuentran en los primeros estadios de la esporulación

1.1. Análisis de la secuencia del genoma de $\phi 29$

El genoma de $\phi 29$ es atrapado en el interior de la espora cuando infecta células de *B. subtilis* que se encuentran en los primeros estadios del proceso de esporulación (Moreno, 1979). Esta estrategia de infección alternativa requiere, por un lado, la supresión del desarrollo lítico del fago y por otro lado, un mecanismo que se encargue de la inserción del genoma del fago en el interior de la pre-espora. Dado que no hay ningún indicio que sugiera que proteínas codificadas por el genoma del fago lleven a cabo estos procesos, se consideró la posibilidad de que el genoma de $\phi 29$ contuviese sitios de unión para proteínas del huésped que pudieran estar implicadas en la estrategia de infección alternativa. Por tanto, se analizó la secuencia del DNA del fago en búsqueda de posibles sitios de unión de proteínas de la bacteria. Por un lado, se buscaron sitios de unión de proteínas involucradas en la segregación del cromosoma, que podrían estar implicadas en la incorporación del genoma del fago en la pre-espora y por otro, de sitios de unión de proteínas implicadas en la regulación de la transcripción durante la esporulación, que podrían estar suprimiendo el desarrollo del ciclo lítico del fago.

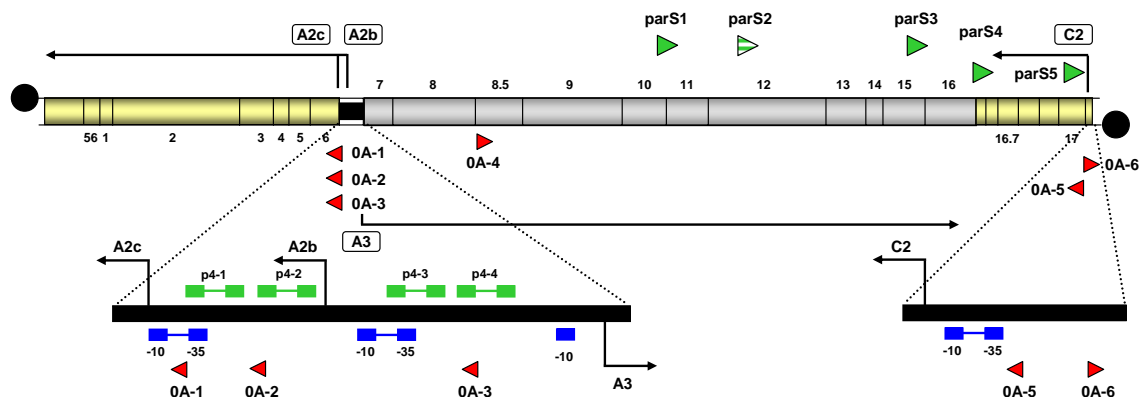


Figura 7. Localización de los sitios *parS* y las cajas OA en el genoma de $\phi 29$. Se muestra un mapa genético y transcripcional del genoma de $\phi 29$. El tamaño de los transcritos y la dirección de la transcripción se indica mediante flechas. La posición de las cajas OA y de los sitios *parS* se indica mediante triángulos rojos y verdes, respectivamente. El triángulo verde rayado indica el sitio *parS* que contiene 2 pb adicionales. La posición de los genes está indicada mediante números. Los círculos negros representan la TP. Las barras negras representan un aumento de la región de los promotores A2b, A2c y A3 y de la región del promotor C2. Las posiciones de inicio de la transcripción se indican mediante flechas curvadas. Los rectángulos azules representan las cajas -10 y -35 de los distintos promotores y los rectángulos verdes indican los sitios de unión de p4. Es importante resaltar que el promotor tardío A3 carece de caja -35.

Una de las proteínas implicadas en la segregación del cromosoma de *B. subtilis* cuya secuencia de reconocimiento en el DNA se conocía por aquel entonces, es la proteína Spo0J (ver Introducción apartado 1.8). La secuencia consenso de su sitio de unión al DNA es una

repetición invertida imperfecta 5'-TGTCACGTGAAACA-3' denominada sitio *parS* (Lin and Grossman, 1998). El genoma de $\phi 29$ presenta cuatro secuencias idénticas a ésta y una más con una inserción de dos pares de bases (Murthy et al., 1998). Los cinco sitios están situados en la mitad derecha del genoma de $\phi 29$ (Figura 7).

El regulador esencial de entrada en esporulación es la proteína Spo0A cuya secuencia consenso de unión al DNA, denominada “caja 0A”, es 5'-TGTCGAA-3' (Strauch et al., 1990). El análisis de la secuencia del genoma de $\phi 29$ reveló que contiene 6 cajas 0A (Figura 7). Una de ellas, 0A-4, está situada en el gen 8,5 que codifica a la proteína de la cabeza del fago. Lo que resulta más interesante es que las otras 5 cajas 0A están situadas en las proximidades de los principales promotores. Tres de ellas, 0A-1, 0A-2 y 0A-3, en la región intergénica donde se localizan los promotores A2c, A2b y A3, y las otras dos, 0A-5 y 0A-6, en las proximidades del promotor temprano C2. Liu et al. (2003) describieron una secuencia ampliada de unión de Spo0A, 5'-**TTGTCGAA**-3'. Como se ve en la Tabla 1, todas las cajas 0A del genoma de $\phi 29$, menos la caja 0A-4, es decir, todas las cajas 0A asociadas a promotores del genoma de $\phi 29$, responden también a esta secuencia consenso ampliada.

Tabla 1. Localización de las cajas 0A en el genoma de $\phi 29$

Nombre	Posición	Inter/intragénica	Secuencia (5'-3')
0A-1	5000 – 4989 ^c	Intergénica, region de los promotores A2c-A3	a TTGTCGAA cag
0A-2	5032 – 5021 ^c	Intergénica, región de los promotores A2c-A3	t TTGTCGAA ctt
0A-3	5139 – 5128 ^c	Intergénica, region de los promotores A2c-A3	c TTGTCGAA aaa
0A-4	7186 – 7197	Gen 8,5	gc TGTCGAA gag
0A-5	19175 – 19164 ^c	Intergénica, <i>upstream</i> del promotor C2	t TTGTCGAA aaag
0A-6	19227 – 19238	Intergénica, <i>upstream</i> del promotor C2	c TTGTCGAA gat

^c: cadena complementaria. La secuencia de 7 pb originalmente descrita como caja 0A consenso aparece en rojo (Strauch et al., 1990). Las posiciones idénticas a la secuencia ampliada recientemente descrita (5'-TTGTCGAA-3') (Liu et al., 2003) está indicada en letras mayúsculas negritas.

A continuación, se estudió si los posibles sitios de unión de Spo0J y Spo0A presentes en el genoma de $\phi 29$ intervienen en la estrategia de infección alternativa.

1.2. Papel de las secuencias *parS* del genoma de $\phi 29$ en la incorporación del genoma del fago en el interior de la pre-espora

La presencia de las secuencias *parS* en el genoma de $\phi 29$ planteaba la posibilidad de que el fago estuviese utilizando el mecanismo de segregación del cromosoma bacteriano, del que forma parte la proteína Spo0J, para incorporar su genoma en la pre-espora.

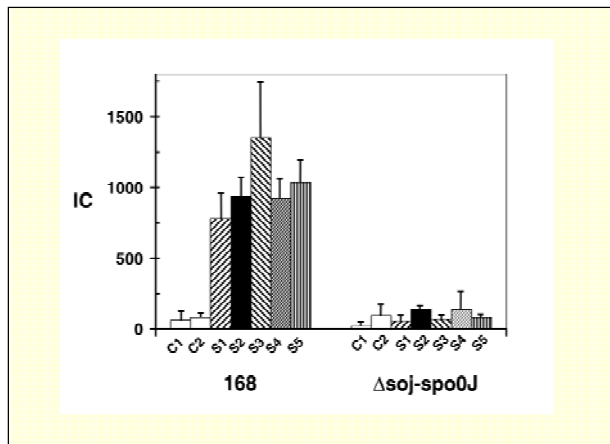


Figura 8. Unión *in vivo* de la proteína Spo0J a los sitios *parS* del genoma de $\phi 29$. Cultivos de la estirpe 168 de *B. subtilis* y de la estirpe isogénica delecionada en el operón *soj-spo0J* ($\Delta soj-spo0J$) se infectaron con $\phi 29$ (m.o.i.=10) y 20 min más tarde se trataron con para-formaldehído para entrecruzar las proteínas y el DNA. Después de procesar las muestras (ver Materiales y Métodos), se analizó el DNA total y el inmunoprecipitado mediante PCR cuantitativa utilizando siete parejas de oligonucleótidos. Cinco de las parejas amplificaban regiones del DNA de $\phi 29$, de aproximadamente 500 pb, que contienen las diferentes secuencias *parS* del genoma del fago (*S1-S5*) y las otras dos parejas amplificaban regiones del genoma de $\phi 29$ que no presentan secuencias *parS* (*C1* y *C2*, regiones del genoma de $\phi 29$ 64-523 y 1022-1548, respectivamente). En la figura se presentan los valores de IC medios de dos experimentos con sus correspondientes desviaciones estándar.

Para determinar si Spo0J es capaz de unirse *in vivo* a las secuencias *parS* presentes en el genoma de $\phi 29$, se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación de proteínas unidas al DNA (CHIP) utilizando células infectadas con $\phi 29$ (ver Materiales y Métodos). Después de entrecruzar las proteínas unidas al DNA y romper el DNA en fragmentos de un tamaño aproximado de 750 pb, se inmunoprecipitaron los posibles complejos Spo0J-DNA con anticuerpos policlonales contra Spo0J. El DNA precipitado se analizó mediante PCR cuantitativa. Se utilizaron siete parejas de oligonucleótidos para llevar a cabo las reacciones de PCR. Cinco de las parejas amplificaban cada uno de las secuencias *parS* del genoma de $\phi 29$ y las otras dos parejas amplificaban fragmentos de DNA, también del

genoma de $\phi 29$, pero que no presentan secuencias similares a la de *parS* y se utilizaron como controles negativos del experimento. La unión de Spo0J a los fragmentos del genoma de $\phi 29$ analizados se expresó mediante el coeficiente de inmunoprecipitación (IC) que representa la cantidad de DNA inmunoprecipitado de una región determinada en función de la cantidad total de DNA de esa región. Como se puede ver en la Figura 8, las regiones del genoma de $\phi 29$ en las cuales se localizan las secuencias *parS* son entre 10 y 23 veces más abundantes en los

inmunoprecipitados que las regiones usadas como controles negativos. Estos experimentos se realizaron en paralelo infectando una estirpe de *B. subtilis* isogénica en la cual se ha deletado el operón *soj-spo0J* (168:: Δ *soj-spo0J*) y por tanto no produce la proteína Spo0J. Los valores de IC obtenidos en estos ensayos fueron mucho más bajos que los valores obtenidos en la estirpe salvaje (wt), para las siete regiones analizadas. Estos resultados demostraron que la proteína Spo0J se une específicamente a las regiones del genoma de ϕ 29 que contienen una secuencia *parS*.

Una vez demostrado que Spo0J se une específicamente a los sitios *parS* del genoma de ϕ 29, analizamos si eran importantes para la incorporación del genoma del fago en la pre-espora. La primera estrategia seguida fue el clonaje de uno de los sitios *parS* de ϕ 29 en un derivado muy inestable desde el punto de vista de la segregación del plásmido de *B. subtilis* pLS20 (Meijer et al., 1995). A continuación, se analizó la eficiencia de incorporación en la pre-espora del plásmido con o sin el sitio *parS*. En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos. El plásmido con el sitio *parS* de ϕ 29 aparecía en más de un 88% de las esporas, mientras que el plásmido sin el sitio *parS* aparecía tan solo en un 28% de las mismas. Estos ensayos se realizaron en paralelo infectando la estirpe de *B. subtilis* 168:: Δ *soj-spo0J*. Se deletó el operón completo debido a la baja tasa de producción de esporas que genera un mutante *spo0J* debido al papel inhibitorio de la transcripción de determinados genes de esporulación que desempeña la proteína Soj (Iretton et al., 1994). En esta situación, la eficiencia de incorporación del plásmido en la pre-espora fue baja independientemente de si contenía o no el sitio *parS*, lo que demostró que la eficiencia alta de incorporación del plásmido con el sitio *parS* en la espora depende de la presencia del operón *soj-spo0J*.

Tabla 2. Eficiencia de incorporación en la pre-espora de plásmidos con o sin el sitio *parS* de ϕ 29 en la estirpe de *B. subtilis* 168 y la estirpe isogénica 168:: Δ *soj-spo0J*

Plásmido	% de esporas que contenían el plásmido ^a	
	168	168:: Δ <i>soj-spo0J</i>
pNeg	28	26
pParSa	89	31
pParSb	93	29

^aMedia de tres experimentos independientes, que difirieron en menos de un 10%
 pNeg: plásmido sin el sitio *parS*
 pParSa y pParSb representan las dos posibles direcciones del inserto

Moreno (1979) describió que la incorporación del genoma de $\phi 29$ en la espora se produce sólo cuando se infectan las células en un pequeño margen de tiempo durante el inicio de la esporulación. Por tanto, se estudió si esta incorporación del genoma de $\phi 29$ en la espora se veía afectada en ausencia de Spo0J. Se infectaron cultivos de las estirpes 168 y 168:: $\Delta soj-spo0J$ a diferentes tiempos después del inicio de la esporulación y se analizó la incorporación del genoma del fago en la espora. Se indujo la entrada sincronizada en esporulación de los cultivos resuspendiéndolos en medio de esporulación (SM). En estas condiciones, los valores más altos de incorporación del genoma de $\phi 29$ se obtuvieron cuando se infectaban las células 40 min después de haberlas resuspendido en medio SM. Aunque los valores de eficiencia de incorporación del genoma de $\phi 29$ en la espora fluctuaron bastante de unos experimentos a otros, los valores de incorporación obtenidos de la infección de la estirpe 168:: $\Delta soj-spo0J$ fueron significativamente más bajos (resultados no mostrados). En conjunto, todos estos datos indican fuertemente que el genoma de $\phi 29$ presenta sitios *parS* funcionales y que el fago es capaz de utilizar el mecanismo de segregación del cromosoma bacteriano para insertar su genoma en el interior de la pre-espora.

1.3. Papel de la proteína Spo0A de *B. subtilis* en el desarrollo del ciclo lítico de $\phi 29$ durante la esporulación

1.3.1. El fago $\phi 29$ forma placas de lisis grandes en estirpes de *B. subtilis* mutantes en genes tempranos de esporulación pero no en la estirpe 168 silvestre

Se conoce que $\phi 29$ forma placa de lisis grandes en estirpes mutantes en algunos genes

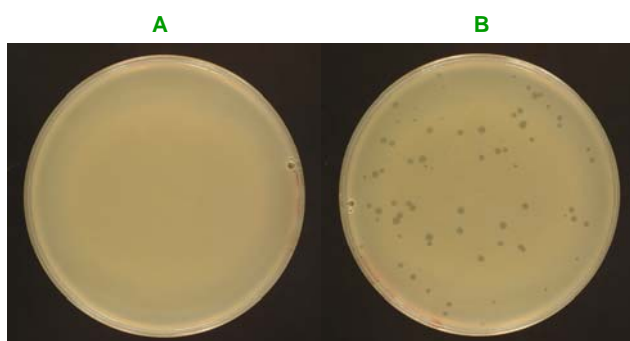


Figura 9. Formación de placas de lisis mediada por $\phi 29$ en la estirpe de *B. subtilis* 168 y en la estirpe 168:: $\Delta spo0A$. Mientras $\phi 29$ forma placas de lisis grandes en la estirpe en la que se ha deletado el gen *spo0A* (B), no es capaz de formarlas en la estirpe 168 (A).

tempranos de esporulación, mientras no es capaz de formarlas, o si las forma, son muy pequeñas, en la estirpe wt (Ito and Spizizen, 1972). Como primera aproximación experimental al posible papel de Spo0A en la inhibición del desarrollo del ciclo lítico de $\phi 29$, se estudió la formación de placas de lisis en la estirpe de *B. subtilis* 168 y una estirpe isogénica con una delección del gen *spo0A* (168:: $\Delta spo0A$). Como se puede

observar en la Figura 9, $\phi 29$ forma placas de lisis grandes en la estirpe 168:: $\Delta spo0A$; sin embargo no es capaz de formarlas en la estirpe wt, lo que sugiere que Spo0A está involucrada en la supresión del desarrollo de $\phi 29$. Además, $\phi 29$ también forma placas de lisis grandes en una estirpe con una mutación en el gen *spo0B* (resultados nos mostrados). Dado que la proteína Spo0B está implicada en la activación por fosforilación de la proteína Spo0A, este resultado sugiere que es la proteína Spo0A en su forma activa la que está implicada en la supresión del desarrollo del fago.

1.3.2. La esporulación provoca la represión de los promotores tempranos de $\phi 29$ y previene la activación del promotor tardío

La supresión del desarrollo de $\phi 29$ podía ser debida a una inhibición global de la transcripción del genoma del fago durante la esporulación. Con el objetivo de estudiar la transcripción desde los principales promotores del fago durante el proceso de esporulación, se infectaron cultivos que habían sido sincronizados para que las células iniciaran a la vez el proceso de esporulación y se analizó la producción de transcritos del fago 25 min después de la infección mediante la extensión de un cebador.

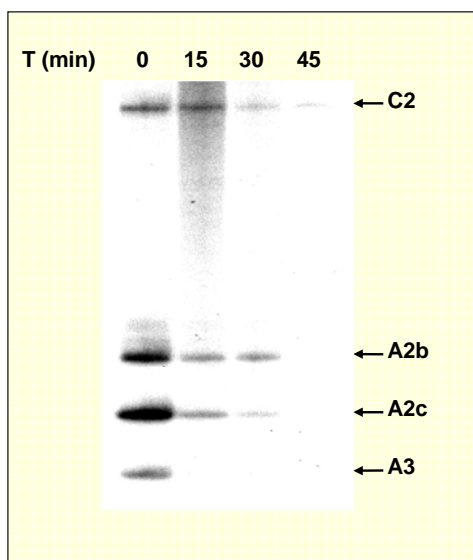


Figura 10. Análisis de la producción de transcritos desde los principales promotores de $\phi 29$ *in vivo* en función del estadio de desarrollo de la bacteria infectada. Se infectaron las células con una m.o.i. de 5 justo después de ser resuspendidas en medio SM ($t=0$) o a diferentes tiempos después de la resuspensión (15, 30 ó 45 min). 25 min después de la infección, se purificó el RNA total y los transcritos producidos desde los principales promotores de $\phi 29$ se analizaron mediante la extensión de un cebador. Los productos de la extensión se analizaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. Los cebadores se diseñaron de tal manera que dieran un tamaño de cDNA diferente para cada promotor (indicados a la derecha de la figura). Se obtuvieron los siguientes valores de abundancia relativa para los transcritos producidos desde los distintos promotores: C2, 100 ($\pm 5,8$), 83,8 ($\pm 6,7$), 18 ($\pm 4,2$), 5,2 ($\pm 2,8$); A2b, 100 ($\pm 7,9$), 26 ($\pm 5,6$), 20 ($\pm 6,3$), <2 ; A2c, 100 ($\pm 2,1$), 19 ($\pm 2,9$), 4 ($\pm 2,3$), <2 ; y A3, 100 ($\pm 4,5$), <2 , <2 , <2 .

Como se puede observar en la Figura 10, cuando se infectaron las células inmediatamente después de ser resuspendidas en SM, se detectaron niveles elevados de transcritos derivados de los principales promotores tempranos del fago. También se detectaron transcritos derivados del promotor tardío A3. Sin embargo, cuando se infectaban las células 15,

30 ó 45 min después de haberlas resuspendido en medio SM, los niveles de transcripción desde los promotores A2b y A2c eran mucho más bajos o incluso apenas detectables. En células infectadas 30 ó 45 min después de la resuspensión, también se veía una bajada en los niveles de transcritos desde el promotor C2. Además, cuando la infección de las células se realizó a los 15 min de la resuspensión o a tiempos posteriores, no se detectaron transcritos del promotor tardío A3. Las diferencias en los niveles de represión entre los distintos promotores del fago sugerían que estos efectos eran específicos de cada promotor y no debidos a una pérdida generalizada de la transcripción durante la esporulación.

1.3.3. Los promotores tempranos de $\phi 29$ son reprimidos *in vivo* de manera dependiente de *spo0A*

Con el objetivo de estudiar si la inhibición de la expresión de los promotores tempranos del fago durante la esporulación era dependiente de *spo0A*, se construyeron fusiones transcripcionales de cada uno de ellos y sus cajas 0A con el gen *lacZ* y se insertó una sola copia en el cromosoma de la estirpe 168 de *B. subtilis*. A continuación, se crearon estirpes isogénicas delecionadas en el gen *spo0A*. Los resultados presentados en la Tabla 3 muestran que, mientras que en las estirpes con el gen *spo0A* intacto la expresión de los promotores tempranos del fago comienza a decaer a medida que las célula inician la esporulación, definido como $t=0$, en las estirpes con el gen *spo0A* delecionado los niveles de expresión siguen aumentando. Los niveles de expresión de Spo0A aumentan considerablemente justo antes del inicio de la esporulación (Strauch et al., 1992) lo que indica que la represión de los promotores tempranos de $\phi 29$ *in vivo* es mediada por Spo0A.

1.3.4. Spo0A se une *in vitro* a las cajas 0A presentes en las proximidades de los promotores tempranos de $\phi 29$

^a Los valores son la media de al menos tres experimentos que difieren entre ellos en menos de un 10%. Cada fusión transcripcional de los promotores con el gen *lacZ* contiene la secuencia del promotor y al menos 19 pb adicionales correspondientes a la secuencia *downstream* de la posición +1. El gen *lacZ* contiene el RBS y los codones de iniciación del gen *sspB* de *B. subtilis* (Daniel et al. 1996). Hay que destacar que los valores de actividad β -galactosidasa que se obtienen de esta construcción son más bajos que los que se obtienen con vectores de integración similares pero donde la expresión de *lacZ* está bajo el control de las señales de traducción del gen *spoVG* de *B. subtilis*.

Aunque los experimentos *in vivo* implican a Spo0A en la represión de los promotores del fago, no permiten distinguir si esta represión es directa o indirecta. El método más adecuado para

estudiar esta cuestión es mediante experimentos *in vitro*. Por tanto, se purificó la proteína

Spo0A de células de *E. coli* que contienen un plásmido con el gen *spo0A* de *B. subtilis* bajo el control de un promotor inducible (Muchová et al., 2004). La fosforilación de Spo0A provoca la dimerización y es la forma dimérica la que interacciona con el DNA (Asayama et al., 1995; Lewis et al., 2002; Ladds et al., 2003; Muchová et al., 2004). Ladds et al. (2003) demostraron que parte de la proteína Spo0A purificada de células de *E. coli* estaba en la forma activa, es decir, fosforilada y en forma de dímero. Mediante filtración en gel, se comprobó que aproximadamente un 40% de la proteína Spo0A obtenida de esta purificación estaba en forma de dímero. Además, se comprobó su funcionalidad con un promotor temprano de esporulación denominado *spoIIG* que necesita la proteína Spo0A para su activación (Satola et al., 1992). Es decir, la huella dejada por Spo0A en el promotor *spoIIG* en ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I es muy similar a la publicada (resultados nos mostrados) y además, como se muestra en el apartado 1.3.5 de resultados, la proteína Spo0A purificada es capaz también de activar la transcripción del gen *spoIIG* en ensayos de transcripción *in vitro*.

Para comprobar si las cajas 0A del genoma de $\phi 29$ son sitios reales de unión de Spo0A, se estudió la protección a la digestión con DNasa I de fragmentos de DNA del genoma del fago que contienen las cajas 0A asociadas a los principales promotores, en presencia o ausencia de la proteína. La Figura 11 muestra que Spo0A se une a las cajas 0A localizadas en las proximidades de los promotores A2c (A), A2b (B) y C2 (C). Las huellas generadas tras la incubación con Spo0A no se limitan a las cajas 0A, sino que se extiende a regiones adyacentes. El análisis de la secuencia de las regiones protegidas reveló que cada una de las cajas 0A analizadas está flanqueada por una semicaja 0A situada a una distancia de 3 pb (ver Figura 12). Estas semicajas están situadas *upstream* de 0A-1 y 0A-2 y *downstream* de 0A-3, 0A-5 y 0A-6. Es importante resaltar que las cajas dobles 0A-1 y 0A-5 solapan parcialmente con las secuencias de los promotores A2c y C2, respectivamente.

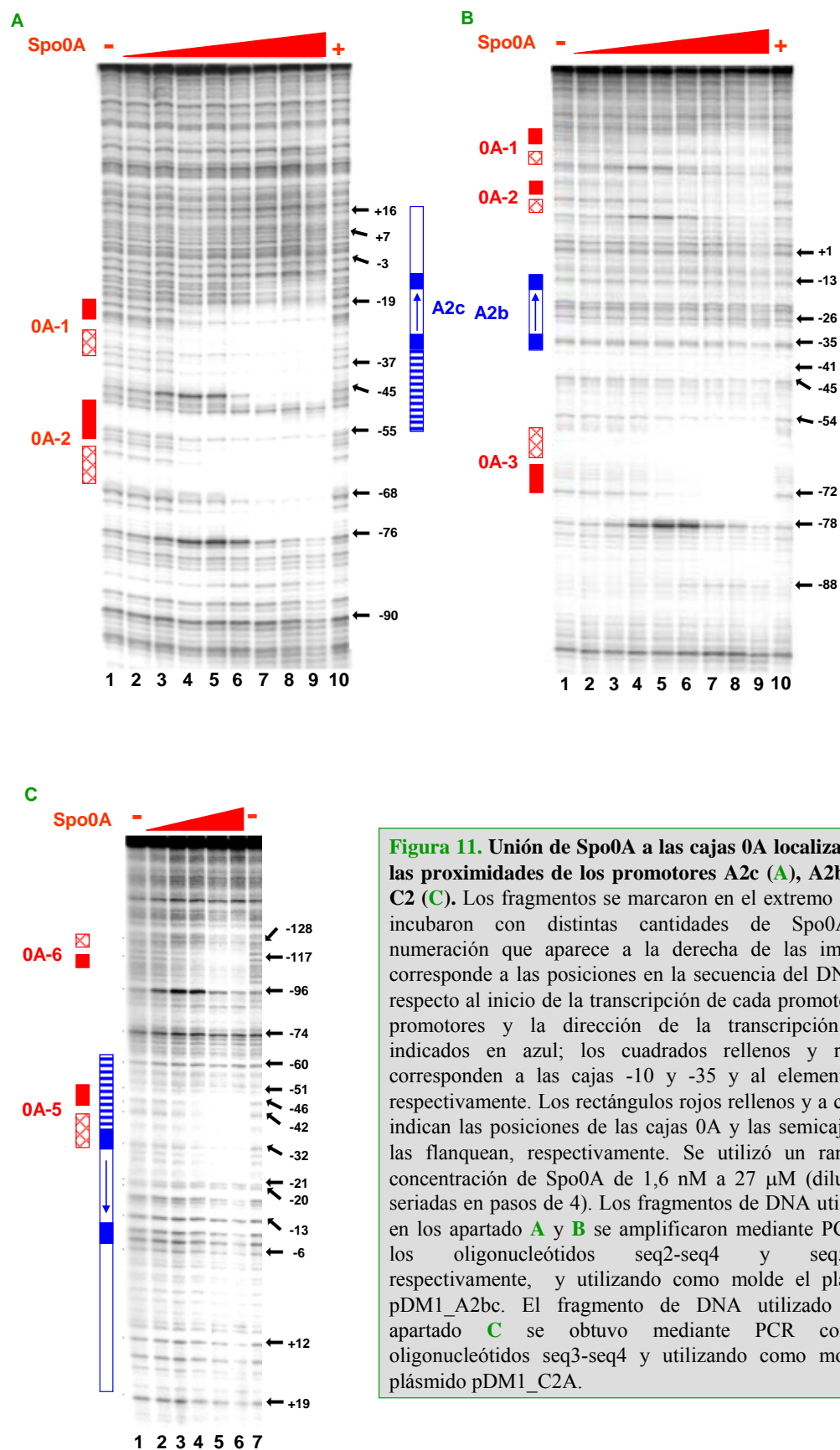


Figura 11. Unión de Spo0A a las cajas 0A localizadas en las proximidades de los promotores A2c (A), A2b (B) y C2 (C). Los fragmentos se marcaron en el extremo 3' y se incubaron con distintas cantidades de Spo0A. La numeración que aparece a la derecha de las imágenes corresponde a las posiciones en la secuencia del DNA con respecto al inicio de la transcripción de cada promotor. Los promotores y la dirección de la transcripción están indicados en azul; los cuadrados rellenos y rayados corresponden a las cajas -10 y -35 y al elemento UP, respectivamente. Los rectángulos rojos rellenos y a cuadros indican las posiciones de las cajas 0A y las semicajas que las flanquean, respectivamente. Se utilizó un rango de concentración de Spo0A de 1,6 nM a 27 μ M (diluciones seriadas en pasos de 4). Los fragmentos de DNA utilizados en los apartados A y B se amplificaron mediante PCR con los oligonucleótidos seq2-seq4 y seq5-seq1, respectivamente, y utilizando como molde el plásmido pDM1_A2bc. El fragmento de DNA utilizado en el apartado C se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos seq3-seq4 y utilizando como molde el plásmido pDM1_C2A.

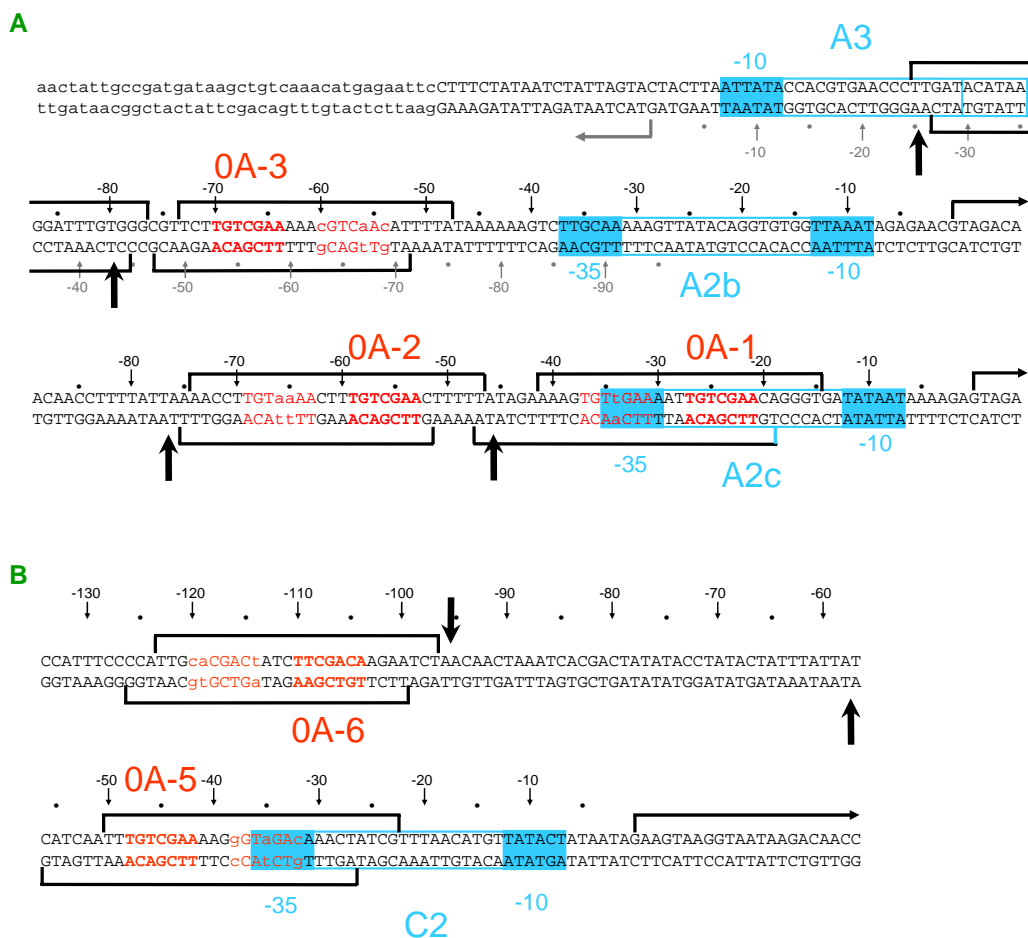


Figura 12. Esquema de las secuencias protegidas por Spo0A en las regiones de los promotores tempranos A2b y A2c (A) y C2 (B). Las barras negras situadas encima y debajo de las secuencias de DNA indican las regiones protegidas por Spo0A en ambas cadenas. La secuencia consenso de unión de Spo0A está indicada con letras negras rojas y las semicajas flanqueantes en letras rojas. Las letras minúsculas rojas indican los nucleótidos desviados respecto de la secuencia consenso de unión de Spo0A. Los sitios de iniciación de la transcripción están indicados mediante flechas curvadas negras. Las cajas -10 y -35 están recuadradas en azul. Las posiciones indicadas por encima o por debajo de las secuencias de DNA corresponden a las posiciones desde el nucleótido iniciador de la transcripción del promotor correspondiente. Las letras mayúsculas corresponden a DNA de ϕ 29 y las minúsculas son secuencias plasmídicas. Las hipersensibilidades observadas tras la incubación con Spo0A en concentraciones medias y bajas están indicadas mediante flechas gruesas negras.

1.3.5. Spo0A reprime la transcripción *in vitro* de los principales promotores del fago

Mediante ensayos de transcripción *in vitro*, se estudió si Spo0A reprime directamente los principales promotores de ϕ 29. Como ya se ha comentado, Spo0A activa la transcripción del gen *spoIIG* (Satola et al., 1992), por lo que se utilizó la activación de este promotor como control positivo del experimento. En la Figura 13 se puede ver que, así como Spo0A activa la

transcripción del gen *spoIIG*, provoca una caída en los niveles de transcripción de los promotores tempranos A2c, A2b, C2 e inhibe la activación del promotor tardío A3, mediada por p4. Como se puede apreciar en la figura, se necesita más cantidad de Spo0A para activar la transcripción de *spoIIG* que para reprimir los promotores de $\phi 29$. Esto es acorde con resultados que se mostrarán más adelante sobre la afinidad de Spo0A por distintos sitios de unión del genoma de $\phi 29$ y del cromosoma de *B. subtilis*.

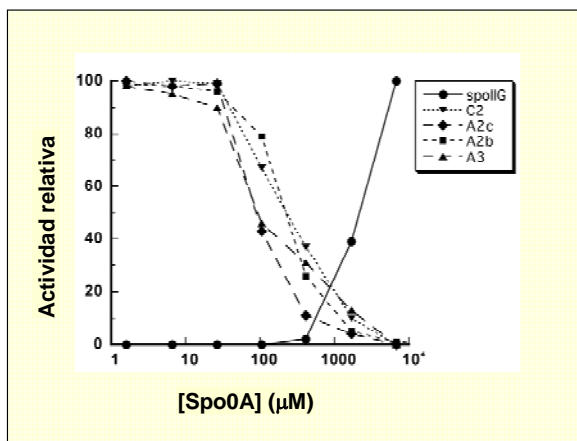


Figura 13. Spo0A reprime las transcripción *in vitro* de los promotores tempranos A2b, A2c y C2 de $\phi 29$ y previene la activación del promotor tardío A3. Mediante ensayos de transcripción *in vitro* se midió la actividad de los promotores tempranos de $\phi 29$ A2c, A2b y C2, la del promotor tardío A3 y la del promotor *spoIIG* de *B. subtilis* en función de la cantidad de Spo0A. Las mezclas de reacción contenían una concentración de 4 nM de cada uno de los moldes de DNA, 40 nM de RNAP y las concentraciones indicadas en la figura de la proteína Spo0A purificada. La actividad relativa de los distintos promotores está dada en función de su actividad máxima en ausencia, para los promotores de $\phi 29$, o en presencia, para el promotor *spoIIG*, de Spo0A. Las actividades relativas indicadas en la figura corresponden a la media obtenida de, al menos tres experimentos, que difirieron entre ellos en menos de un 10%.

1.3.6. Spo0A reprime los promotores tempranos A2b y A2c impidiendo la unión de la RNAP

El efecto inhibitorio de la transcripción ejercido por Spo0A podría ser a distintos niveles. La unión de Spo0A a las cajas 0A del genoma de $\phi 29$ podría estar afectando a la formación del complejo cerrado de transcripción, por lo que se realizaron ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I en presencia de RNAP y en presencia o ausencia de Spo0A. Como se ve en el carril 1 de la Figura 14A, la RNAP se une al promotor A2c generando una huella en la cadena molde del DNA que se extiende desde la posición +16 a la -57 y generando una hipersensibilidad al corte con DNasa I en la posición -37, considerando la posición +1 al nucleótido iniciador de la transcripción del promotor A2c (Monsalve et al., 1996b). Sin embargo, la RNAP no es capaz de unirse a este promotor cuando Spo0A se une a las cajas 0A-1 y 0A-2 (carriles 7 a 10 de la misma figura).

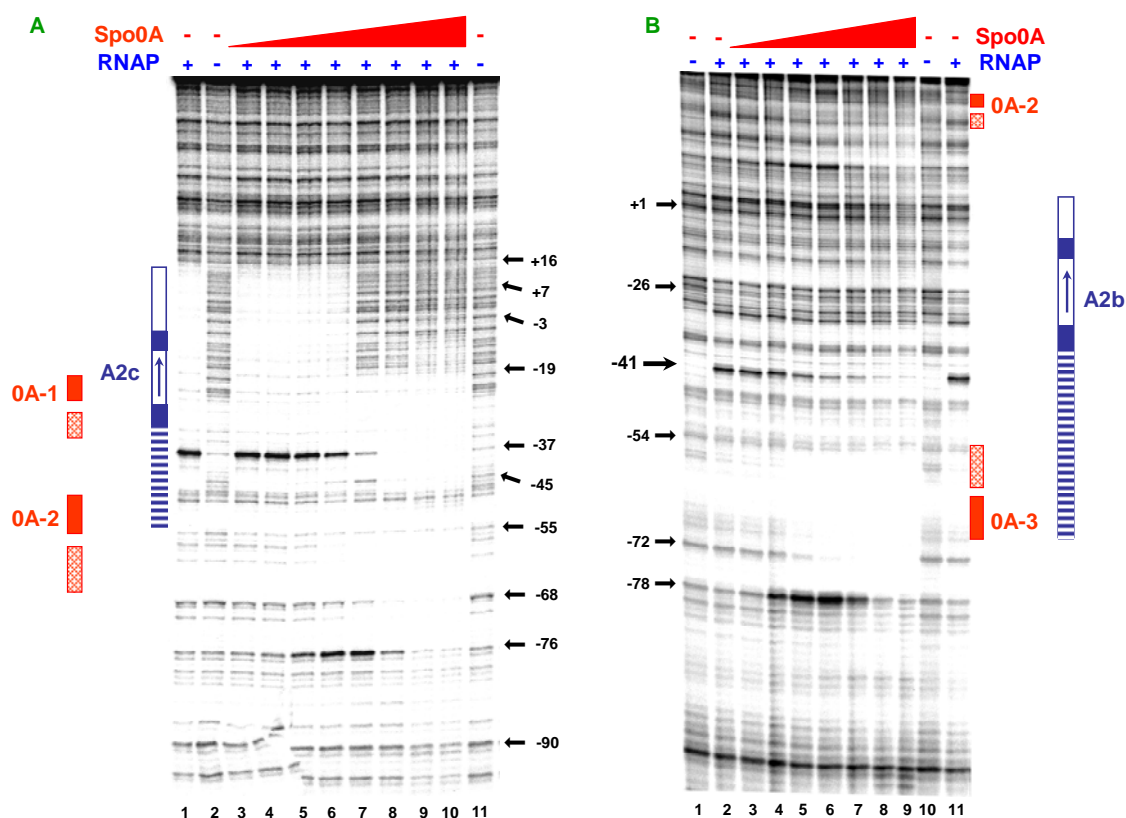


Figura 14. Análisis, mediante ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I, de la unión de RNAP a los promotores A2c (A) y A2b (B) en presencia de Spo0A. Los fragmentos se marcaron en el extremo 3' y se incubaron con cantidades crecientes de Spo0A y una concentración de 70 nM de RNAP. La numeración que aparece al lado de las imágenes corresponde a las posiciones en el DNA con respecto al inicio de la transcripción desde cada promotor. La región de los promotores y la dirección de la transcripción está indicada en azul; los cuadrados rellenos y rayados corresponden a las cajas -10 y -35 y al elemento UP, respectivamente. Los rectángulos rojos rellenos y a cuadros indican las posiciones de las cajas 0A y las semicajas que las flanquean, respectivamente. La posición -41 de B indica la hipersensibilidad característica que genera la unión de la RNAP al promotor temprano A2b. Se utilizó un rango de concentración de Spo0A de 1,6 nM a 27 μ M (diluciones seriadas en pasos de 4). Los fragmentos utilizados como moldes en ambos apartados son los mismos que se utilizaron en los apartados A y B de la Figura 11.

El promotor A2b es un promotor fuerte, pero la RNAP se une débilmente al mismo en ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I. Una de los cambios más característicos que produce al unirse, es la aparición de un sitio hipersensible al corte por la DNasa I en la cadena molde en la posición -41 respecto del inicio de la transcripción del promotor A2b (carril 2 de la figura 14B). Esta banda hipersensible en posición -41 no se observa en presencia de Spo0A unida a la caja 0A-3 (carriles del 3 al 9 de la misma figura). Por tanto, la unión de Spo0A a la caja 0A-3 impide la unión de la RNAP al promotor A2b.

1.3.7. La proteína Spo0A previene la activación del promotor tardío A3

La Figura 13 muestra que la activación *in vitro* de la transcripción del promotor A3 es inhibida de una manera dependiente de Spo0A. Como se explicó en la introducción (ver apartado 2.1), este promotor carece de caja -35 por lo que necesita la proteína temprana p4 para estabilizar la RNAP en el promotor y dar lugar al inicio de la transcripción (Mencía et al., 1996). El sitio 3 de unión de p4, que es al que se une la proteína para activar el promotor A3, está localizado entre las posiciones -69 a -95 respecto del inicio de la transcripción desde el promotor tardío. Curiosamente, la caja 0A-3 se localiza entre el sitio 3 de unión de p4 y el promotor A3, por lo que la unión de Spo0A a esta caja podría interferir con la activación, mediada por p4, del promotor A3. Esta posibilidad se estudió mediante ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I. Se utilizó como molde un fragmento de DNA que contenía: el promotor A3, la caja 0A-3, el sitio 3 de unión de p4, y el promotor A2b. Como se puede apreciar en los carriles 2 y 13 de la Figura 15, la incubación de este fragmento con cantidades crecientes de Spo0A y su posterior tratamiento con DNasa I reveló que la unión de Spo0A no se limitaba a la región definida por la caja y semicaja 0A-3, sino que su unión se extendía hacia regiones comprendidas entre las posiciones -44 a -26 respecto del inicio de la transcripción del promotor A3 que carecían de secuencias similares a la de las cajas 0A. Como era de esperar, la RNAP sólo aparece unida al promotor en presencia de la proteína p4 (carril 9) y en esta situación, las bandas hipersensibles características de la unión de p4 al sitio 3 son más patentes que en ausencia de la RNAP reflejando la unión cooperativa de ambas proteínas a este promotor (ver carril 9 en comparación con carril 11, Rojo et al., 1998). La unión de Spo0A a la región localizada entre el sitio 3 de unión de p4 y el promotor A3 da lugar a una pérdida de la huella de la RNAP, aunque todavía se observan características de la unión de p4 al sitio 3 (ver carriles del 3 al 8). Esto indica que las proteínas p4 y Spo0A pueden unirse de forma simultánea en las proximidades del promotor tardío del fago, pero la unión de Spo0A a 0A-3 interfiere con el reclutamiento de la RNAP al promotor mediado por p4.

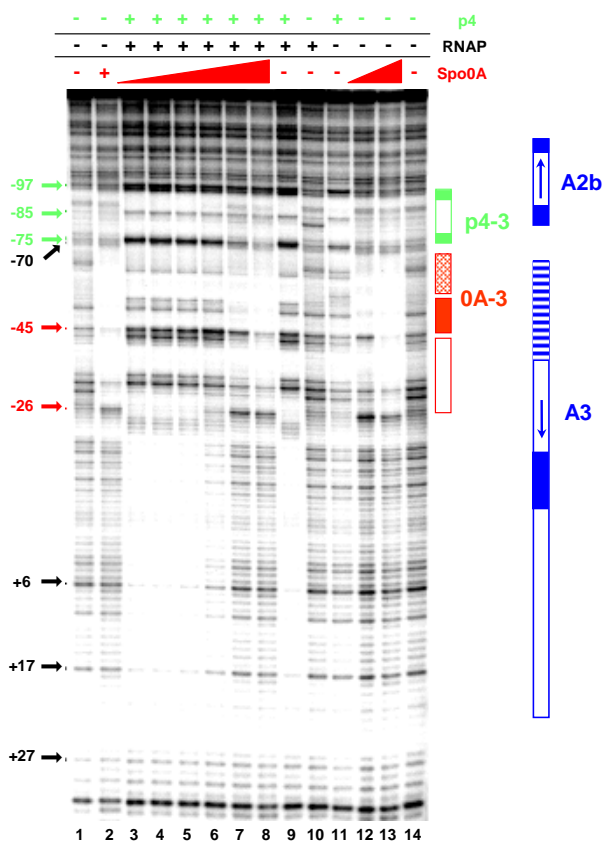


Figura 15. La unión de Spo0A a la región de la caja y semicaja 0A-3 previene el reclutamiento de la RNAP al promotor tardío A3 mediado por p4. El fragmento de DNA utilizado incluye el promotor A3, la caja y semicaja 0A-3, el sitio 3 de unión de p4 y el promotor temprano A2b. A la izquierda de la imagen se indican las posiciones en el DNA con respecto al inicio de la transcripción desde el promotor A3. Las hipersensibilidades generadas por la unión de Spo0A y p4 se indican en rojo y en verde, respectivamente, y las regiones protegidas por la unión de ambas proteínas está representada mediante rectángulos usando los mismos colores. Los rectángulos rojos y a cuadros representan la posición de la caja y semicaja 0A, respectivamente. La región adicionalmente protegida tras la unión de Spo0A está representada mediante un rectángulo con línea roja. El cuadrado azul relleno representa la caja -10 del promotor A3 y el rectángulo con línea azul, la región protegida por la unión de la RNAP al promotor. Las concentraciones usadas de RNAP y p4 fueron de 35 nM y 2,3 μ M, respectivamente. Se utilizó un rango de Spo0A comprendido entre 6,6 nM y 6,7 μ M. En los carriles 12 y 13 se utilizó una concentración de 1,7 y 6,7 μ M de Spo0A, respectivamente, y en el carril 2 una concentración de 6,7 μ M. El fragmento utilizado como molde se amplificó mediante PCR con los oligonucleótidos seq5-A2bL2 y utilizando como molde el plásmido pDM_A3.

1.3.8. La represión mediada por Spo0A del promotor temprano C2 es debida a la inhibición de la formación del complejo abierto de transcripción

La misma estrategia usada para el estudio del efecto de Spo0A sobre la unión de la RNAP a los promotores A2c, A2b y A3, se siguió para el estudio del promotor C2. La RNAP se une a este promotor generando una huella en la cadena no codificante del DNA que se extiende desde la posición -50 a la +19, relativas al inicio de la transcripción desde el promotor C2 (carril

8 de la figura 16A). Además, la unión de la RNAP genera unas hipersensibilidades en las posiciones -20 y -21 y protege parcialmente la posición -60 (Meijer and Salas, 2004).

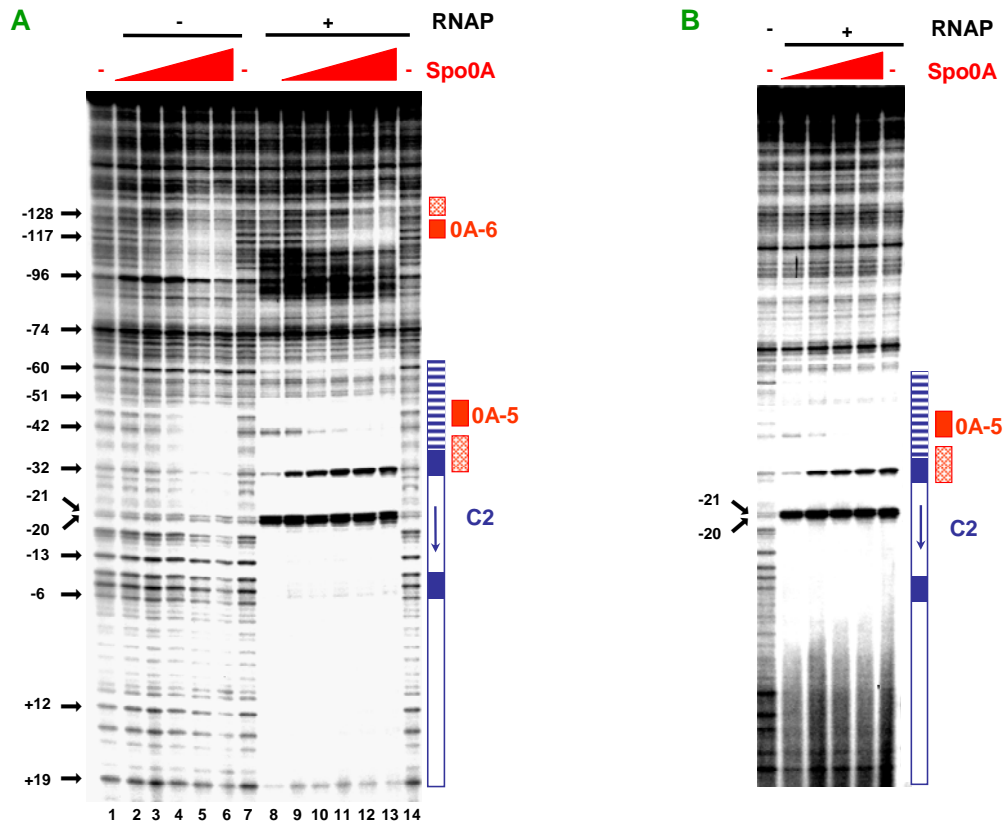


Figura 16. Análisis de la unión de RNAP al promotor temprano C2 en presencia o ausencia de Spo0A mediante ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I. **(A)** El fragmento utilizado contiene las cajas 0A-5 y 0A-6. **(B)** El fragmento utilizado no contiene la caja 0A-6. Los fragmentos se marcaron en el extremo 3' y se incubaron con cantidades crecientes de Spo0A y una concentración de 70 nM de RNAP. La numeración que aparece al lado de las imágenes corresponde a las posiciones en el DNA con respecto al inicio de la transcripción desde el promotor C2. Las cajas -10 y -35 del promotor están indicadas con rectángulos azules, la región del elemento UP mediante un rectángulo azul rayado y el rectángulo con línea azul representa la huella dejada por la unión de la RNAP. Los rectángulos rojos rellenos y a cuadros indican las posiciones de las cajas 0A y las semicajas que las flanquean, respectivamente. **(A)** En los carriles del 2 al 6 se ve la huella dejada por la unión de Spo0A a 0A-5 y 0A6, y en los carriles del 9 al 13, la unión conjunta de la RNAP y Spo0A. **(B)** Unión de Spo0A y RNAP al fragmento de DNA que contiene el promotor C2 y la caja 0A-5 pero que no contiene la caja 0A-6. En ambos casos las concentraciones de Spo0A iban de 26,4 nM a 6,7 μ M mediante diluciones seriadas en pasos de 4. El fragmento utilizado como molde en el apartado **A** es el mismo que el utilizado en el ensayo mostrado en la Figura 11C y el fragmento utilizado en **B** fue amplificado utilizando los mismos oligonucleótidos pero usando como molde el plásmido pDM1_C2b.

Los carriles del 4 al 6 de la Figura 16A, muestran que la huella generada por la unión de Spo0A a la caja 0A-5 incluye la caja -35 del promotor C2. Aunque la unión de Spo0A a la caja 0A-5 ocupa parte del promotor C2, no impide la unión de la RNAP al promotor (ver carriles del 9 al 13 de la misma figura). Sin embargo, la unión simultánea de las dos proteínas provoca

algunas alteraciones en el patrón de protección característico generado por la unión de la RNAP al mismo. Así, causa un aumento en la hipersensibilidad de la posición -32, una protección parcial de la posición -7 y una protección total de la posición -60. La unión de Spo0A a la caja 0A-5 es la causante de estas modificaciones ya que se llevó a cabo el mismo ensayo con un fragmento de DNA más pequeño que no contenía la caja 0A-6 y se observó el mismo patrón de unión de la RNAP (Figura 16B).

Muchos promotores bacterianos poseen, además de las cajas -10 y -35 que son reconocidas por la subunidad σ de la RNAP, una secuencia rica en bases AT situada *upstream* de la caja -35 y que se ha denominado elemento UP (revisado en, Gourse et al., 2000). Este elemento UP sirve como sitio de unión del α CTD de la RNAP y su presencia estimula la formación del complejo cerrado de iniciación de la transcripción. El promotor temprano C2 de ϕ 29 presenta un elemento UP (Meijer and Salas, 2004) y la unión de α CTD al mismo provoca la protección de la región comprendida entre las posiciones -46 a -50 y la protección parcial de la posición -60. Por tanto, la unión de Spo0A a la caja 0A-5 no sólo ocupa parte de la caja -35 del promotor C2, sino que también ocupa parte del elemento UP. Para estudiar si el aumento en la protección de la posición -60 que se observa en presencia de Spo0A era debido a una unión más fuerte de α CTD a esta región, se llevaron a cabo ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I en presencia de una RNAP que contiene una α CTD con los 15 últimos aminoácidos (aa) del dominio C-terminal deletionados (RNAP- $\alpha\Delta 15$) (Figura 17) (Mencía et al., 1996).

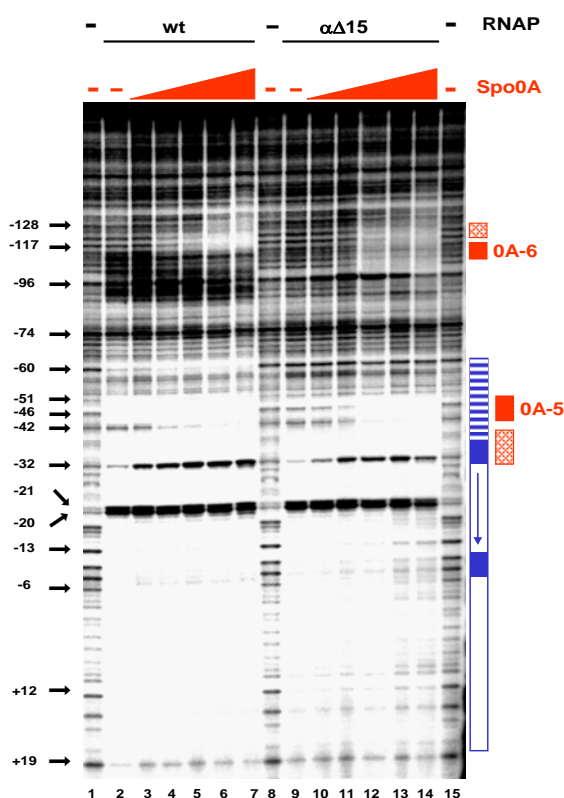


Figura 17. Comparación de la unión simultánea de Spo0A y RNAP o RNAP- $\alpha\Delta 15$ al promotor C2 mediante ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I. El fragmento utilizado contenía el promotor C2 y las cajas 0A-5 y 0A-6; se marcó en el extremo 3' y se incubó con cantidades crecientes de Spo0A y una concentración de 70 nM de RNAP (carriles del 2 al 7) o RNAP- $\alpha\Delta 15$ (carriles del 9 al 14). La numeración que aparece a la izquierda de la imagen corresponde a las posiciones en el DNA con respecto al inicio de la transcripción desde el promotor C2. Las cajas -10 y -35 del promotor están indicadas con rectángulos azules, la región del elemento UP mediante un rectángulo azul rayado y el rectángulo con línea azul representa la huella dejada por la unión de la RNAP. Los rectángulos rojos rellenos y a cuadros indican las posiciones de las cajas 0A y las semicajas que las flanquean, respectivamente. Las concentraciones de Spo0A iban de 26,4 nM a 6,7 μ M (diluciones seriadas en pasos de 4). El fragmento utilizado como molde es el mismo que el utilizado en el ensayo presentado en la Figura 11C.

La unión de RNAP- $\alpha\Delta 15$ al promotor C2 se limita a la región de las cajas -10 y -35 (Figura 17, carril 9, Meijer and Salas, 2004). La presencia de Spo0A y RNAP- $\alpha\Delta 15$ provoca la protección de la posición -46 por la unión de Spo0A, pero la posición -60 aparece desprotegida, lo que demuestra que α CTD es la responsable de la protección total de la posición -60 que se observa en presencia de la RNAP y Spo0A unida a la caja 0A-5 (comparar carriles 7 y 14 de la Figura 17). Más aún, la comparación de las huellas en presencia de Spo0A y de RNAP o RNAP- $\alpha\Delta 15$ reveló que, en ambas situaciones, la posición -32 se volvía hipersensible al corte por la DNasa I. Además, exceptuando la posición -7, la región de la caja -10 aparecía totalmente protegida en presencia de RNAP independientemente de la cantidad de Spo0A usada, pero sólo parcialmente protegida y únicamente en las concentraciones de Spo0A más bajas en presencia de RNAP- $\alpha\Delta 15$. Estos resultados indicaban que la hipersensibilidad dependiente de Spo0A en la posición -32 no requiere la unión de α CTD y que la unión de α CTD a la posición -60 es necesaria para la unión estable de la RNAP al promotor C2 en presencia de Spo0A.

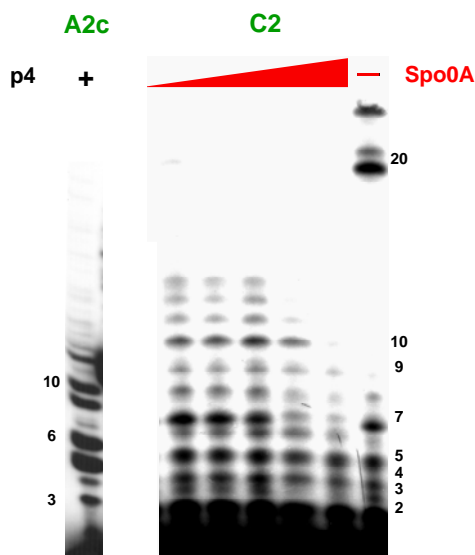


Figura 18. Spo0A inhibe la transcripción abortiva del promotor C2. Las reacciones contenían una concentración de 5 nM del fragmento de DNA molde y 500 ng de RNAP. Después de 10 min de incubación a 37°C, se añadió Spo0A a las concentraciones indicadas. Tras 10 minutos de incubación a 37°C, se disparó la reacción añadiendo 200 μ M de GTP, CTP, y UTP, y 2,5 μ Ci de [α - P^{32}] ATP y se incubó la reacción 30 min a 37°C. Las muestras se analizaron en un gel del 20% de poliacrilamida desnaturalizante. Como control positivo se llevó cabo el mismo experimento en paralelo con el promotor A2c. El rango de Spo0A utilizado iba de 26,4 nM a 6,7 μ M (diluciones seriadas en pasos de 4).

El hecho de que Spo0A y la RNAP se puedan unir de forma simultánea al promotor C2 provocando una represión de la transcripción, recuerda al mecanismo de represión, mediado por p4 al unirse al sitio 2, del promotor temprano A2c. La unión simultánea de p4 y la RNAP al promotor A2c provoca la inhibición de la transcripción de este promotor por una sobreestabilización de la RNAP en el promotor. Aunque en esta situación la RNAP es capaz de generar ciclos de transcripción abortiva, no es capaz de escapar del promotor (Monsalve et al., 1996b). Los resultados presentados en la Figura 18 muestran que el mecanismo de represión del promotor C2 mediado por Spo0A es diferente del mecanismo de represión del promotor A2c mediado por p4 ya que la transcripción abortiva desde el promotor C2 es inhibida de una

manera dependiente de Spo0A. Este resultado sugería que la inhibición de la transcripción del promotor C2, mediada por Spo0A, se debe a efectos sobre pasos anteriores a la producción de transcritos abortivos. Durante la iniciación de la transcripción, el paso siguiente a la formación del complejo cerrado y anterior a la transcripción abortiva es la formación del complejo abierto. Ensayos de sensibilidad a KMnO_4 , reactivo que ataca preferentemente residuos de timina en banda simple, demostraron que la unión de Spo0A a la caja y semicaja 0A-5 inhibe la formación del complejo abierto de transcripción en el promotor temprano C2 (Figura 19).

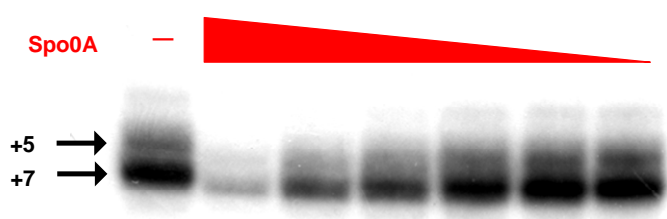


Figura 19. Spo0A inhibe la formación del complejo abierto de la transcripción del promotor C2. Se incubó un fragmento de DNA, que contenía el promotor C2 y regiones *upstream*, con RNAP (140 nM) y cantidades crecientes de Spo0A y se ensayó su sensibilidad al tratamiento con KMnO_4 . Las posiciones que se vuelven hipersensibles tras el tratamiento con KMnO_4 están indicadas. El rango de concentración de Spo0A usado comprende valores desde 26,4 nM hasta 6,7 μM mediante diluciones seriadas en pasos de 4.

1.4. Spo0A reprime la replicación del DNA de $\phi 29$

1.4.1. Spo0A reprime la replicación *in vivo* del DNA de $\phi 29$

Los experimentos descritos y ensayos de transcripción *in vitro* utilizando un fragmento de DNA que contiene el promotor C2 y la caja 0A-5 pero que no contiene la caja 0A-6 demostraron que la caja 0A-6 no está implicada en la represión mediada por Spo0A de la transcripción del promotor C2 (resultados no mostrados). La caja 0A-6 está localizada a 50 pb del extremo derecho del genoma de $\phi 29$ y está orientada en dirección contraria a la de la caja 0A-5 (ver Figura 7). La replicación del DNA de $\phi 29$ se lleva a cabo mediante un mecanismo denominado replicación mediada por proteína, y ambos extremos del genoma constituyen los orígenes de replicación (ver Introducción apartado 2.3). La proteína p6 se une preferentemente a los extremos del genoma del fago formando un complejo con el DNA que estimula la iniciación de la replicación (Blanco et al., 1986; Serrano et al., 1989). La caja 0A-6 solapa con el sitio de nucleación de la proteína p6 (Serrano et al., 1989). Esto sugiere que la unión de Spo0A a la caja 0A-6 podría estar interfiriendo con la iniciación de la replicación del genoma del fago. Para

estudiar esta posibilidad, como primer abordaje se analizó la replicación del genoma del fago *in vivo* en presencia o ausencia de Spo0A. Para ello, se utilizaron dos aproximaciones diferentes. Por un lado, se estudió la replicación del DNA del fago infectando células en fase de esporulación de la estirpe 168 de *B. subtilis* y de la estirpe 168:: $\Delta spo0A$. Para ello, se crecieron las células en medio Schaeffer (medio rico de esporulación) y se infectaron con $\phi 29$ una hora después de entrar en la fase de crecimiento estacionario. Como medida de la replicación se cuantificó, mediante PCR cuantitativa, la cantidad de DNA del fago producida a distintos tiempos después de la infección. La Figura 20A muestra que la cantidad de DNA viral comienza a aumentar a los 20 min de la infección en la estirpe 168:: $\Delta spo0A$ pero no en la estirpe wt. Estos resultados demuestran que $\phi 29$ es capaz de replicar su genoma en células 168:: $\Delta spo0A$ que se encuentran en la fase estacionaria de crecimiento pero que no es capaz de replicar su genoma en la estirpe wt, lo que implica que la replicación del genoma del fago es inhibida de una manera dependiente de *spo0A*.

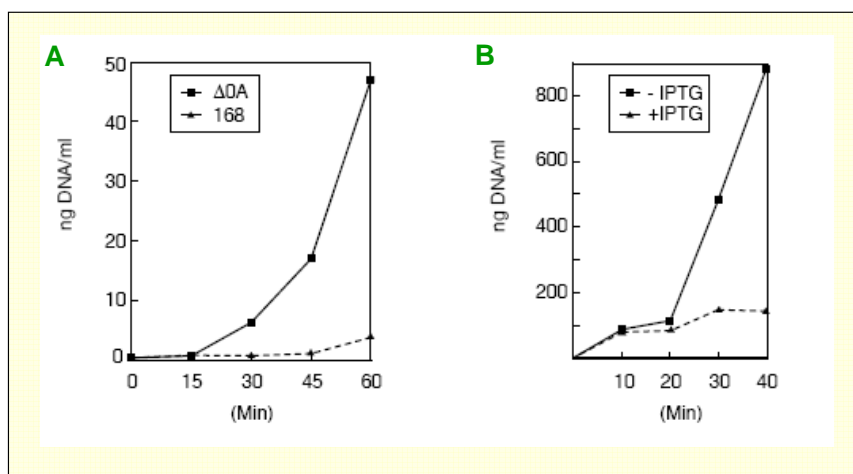


Figura 20. La replicación del genoma de $\phi 29$ *in vivo* es inhibida de manera dependiente de *spo0A*. (A) Cultivos de la estirpe 168 de *B. subtilis* y de la estirpe isogénica delecionada en el gen *spo0A* (ΔOA), se crecieron en medio Schaeffer y se infectaron con $\phi 29$, a una m.o.i. de 5, 1 hora después de la entrada en fase estacionaria. A los tiempos posteriores a la infección indicados, se cuantificó la cantidad producida de DNA viral mediante PCR cuantitativa. Los valores obtenidos se expresaron como ng de DNA viral por ml de cultivo. (B) Se creció en medio LB un cultivo de la estirpe de *B. subtilis* sad67::Tc que contiene el gen *spo0A-sad67* bajo el control de un promotor inducible por IPTG. A mitad de la fase de crecimiento exponencial, se dividió el cultivo en dos y en uno de ellos se indujo la expresión del gen *spo0A-sad67*. A los 10 min, se infectaron los dos cultivos con $\phi 29$ a una m.o.i. de 10. A continuación, se cuantificó la cantidad de DNA viral producida mediante PCR cuantitativa a los tiempos indicados posteriores a la infección. Los datos se expresaron como ng de DNA viral por ml de cultivo.

Por otro lado, se estudió la replicación infectando células durante la fase de crecimiento exponencial, utilizando una estirpe en la que se produce una inducción artificial de Spo0A. Esta estirpe, denominada sad67::Tc, posee un mutante del gen *spo0A*, *spo0A-sad67*, cuya expresión está bajo el control de un promotor que se induce en presencia de IPTG (Veening et al., 2005).

La proteína Spo0A-Sad67 posee una delección de 19 aminoácidos en el dominio N-terminal que provoca que se encuentre en su forma activa sin necesidad de ser fosforilada (Ireton et al., 1993). Por tanto, se llevaron a cabo medidas de la cantidad de DNA del fago producida en células infectadas, crecidas en medio LB, con y sin inducción de Spo0A-Sad67. Como se esperaba, en la Figura 20B se observa que $\phi 29$ replica su genoma en ausencia de IPTG. Sin embargo, cuando se induce la expresión de la proteína Spo0A-Sad67, se observa una inhibición de la replicación del DNA de $\phi 29$.

1.4.2. Spo0A reprime la amplificación *in vitro* del DNA de $\phi 29$

De los estudios realizados *in vivo*, no se puede concluir si el papel que juega Spo0A en la inhibición de la replicación es directo o indirecto. Por ello, se estudió el efecto de Spo0A sobre el sistema de amplificación *in vitro* del genoma de $\phi 29$. Este sistema, que permite la amplificación de cantidades pequeñas de DNA, requiere cuatro proteínas virales: la DNAP, la TP, la p6 y la p5 (Blanco et al., 1994). La Figura 21 muestra que Spo0A inhibe la amplificación *in vitro* del DNA de $\phi 29$. Este efecto directo de Spo0A sobre la amplificación no es debido a una posible unión inespecífica de la proteína al DNA ya que Spo0A no afecta ni a la eficiencia ni a la velocidad de la DNAP de $\phi 29$ en un ensayo de amplificación de M13 en el que la DNAP realiza numerosas rondas de replicación de forma continua utilizando como molde un DNA circular “primado” con un oligonucleótido (resultado no mostrado).

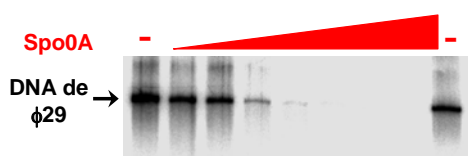


Figura 21. Spo0A reprime la amplificación *in vitro* del DNA de $\phi 29$.

Las mezclas de reacción contenían DNAP (6 nM), TP (6,5 nM), TP-DNA de $\phi 29$ (32 pM), p6 (33,3 μ M), p5 (24 μ M) y ausencia o presencia de cantidades crecientes de Spo0A. Después de incubar las reacciones 45 min a 30°C, se pararon y se sometieron a electroforesis en geles alcalinos de agarosa. Se indica la posición en la que migra el genoma completo de $\phi 29$. El rango de concentración de Spo0A utilizado iba de 1,25 μ M a 80 μ M (diluciones seriadas en pasos de 2).

1.4.3. La inhibición de la replicación mediada por Spo0A es al nivel de iniciación de la replicación

Para estudiar si Spo0A afecta específicamente a la iniciación de la replicación, se realizaron ensayos de iniciación en presencia y ausencia de Spo0A. Como se observa en la

Figura 22, la iniciación es inhibida de una manera dependiente de la dosis de Spo0A. Niveles bajos de iniciación se pueden obtener en ausencia de p6 (Blanco et al., 1986). En estas condiciones, Spo0A no provoca variaciones significativas en los niveles de iniciación (resultados no mostrados). Estos resultados indican que el papel inhibitorio ejercido por Spo0A sobre la replicación del DNA de $\phi 29$ es a nivel de la iniciación mediada por la proteína p6.

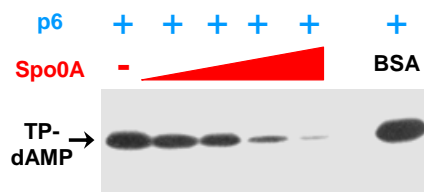


Figura 22. Spo0A reprime la iniciación de la replicación del DNA de $\phi 29$ *in vitro*. Se midió la iniciación de la replicación en presencia de cantidades crecientes de Spo0A. Las mezclas de reacción contenían DNAP (12 nM), TP (12,9 nM), TP-DNA de $\phi 29$ (1,6 nM), p6 (33,3 μ M), 0,1 μ M de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (1 μ Ci) y ausencia o presencia de cantidades crecientes de Spo0A. Después de incubar las reacciones 5 min a 30°C, se pararon, se procesaron y se analizaron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes. En la figura se indica la posición en la que migra el producto de la iniciación, TP-dAMP. El rango de concentración de Spo0A utilizado iba de 2 μ M a 16 μ M (diluciones seriadas en pasos de 2). La concentración de BSA utilizada fue de 16 μ M

1.4.4. Spo0A se une a los extremos del DNA de $\phi 29$ impidiendo la formación del complejo p6-DNA

Los resultados obtenidos en los que se observa que Spo0A inhibe casi completamente la replicación del genoma estimulada por p6, sugieren que Spo0A afecta a la iniciación en ambos extremos, por lo que podría ser que Spo0A se uniese a ambos extremos del genoma del fago interfiriendo con la unión de la proteína p6. Para ahondar en esta posibilidad primero se estudió la unión de Spo0A a fragmentos de DNA correspondientes a las 202 últimas pb de ambos extremos mediante ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I. La Figura 23 muestra que Spo0A protege una región de aproximadamente 45 pb cercana a ambos extremos. La huella generada por Spo0A al unirse en ambos extremos es de tamaño muy similar. Lo que resultó muy interesante es que estas regiones protegidas por Spo0A contienen 4 secuencias consecutivas similares a las típicas cajas 0A separadas unas de otras por 3 pb. Además, estas secuencias se sitúan en posiciones exactamente equidistantes en ambos extremos (Figura 23C).

Una vez demostrada la unión de Spo0A a ambos extremos del genoma, se estudió si la presencia de Spo0A unida en los extremos del genoma afecta a la unión de p6. La unión de la proteína p6 a los extremos del genoma genera un patrón muy característico de bandas hipersensibles separadas por regiones protegidas del corte con DNasa I (ver carril 8 de la Figura

23A y B) (Serrano et al., 1989). La unión de Spo0A a las regiones anteriormente descritas hace que se pierda completamente este patrón por lo que, efectivamente, Spo0A está interfiriendo con la formación del complejo nucleoproteico p6-DNA (carriles del 9 al 12 de la Figura 23A y B). La unión de p6 genera una huella que se extiende a lo largo de todo el fragmento de DNA utilizado en el ensayo. La unión de Spo0A a su sitio de unión no sólo impide la unión de p6 a esa región sino que impide también su unión a regiones en las que Spo0A no está unida. Resultados muy similares se obtuvieron cuando se añadió Spo0A una vez formado el complejo nucleoproteico, lo que indica que Spo0A es además capaz de deshacer un complejo de iniciación ya formado.

Todos estos resultados indican que Spo0A inhibe directamente la replicación del DNA de ϕ 29 impidiendo la formación del complejo nucleoproteico iniciador de la replicación.

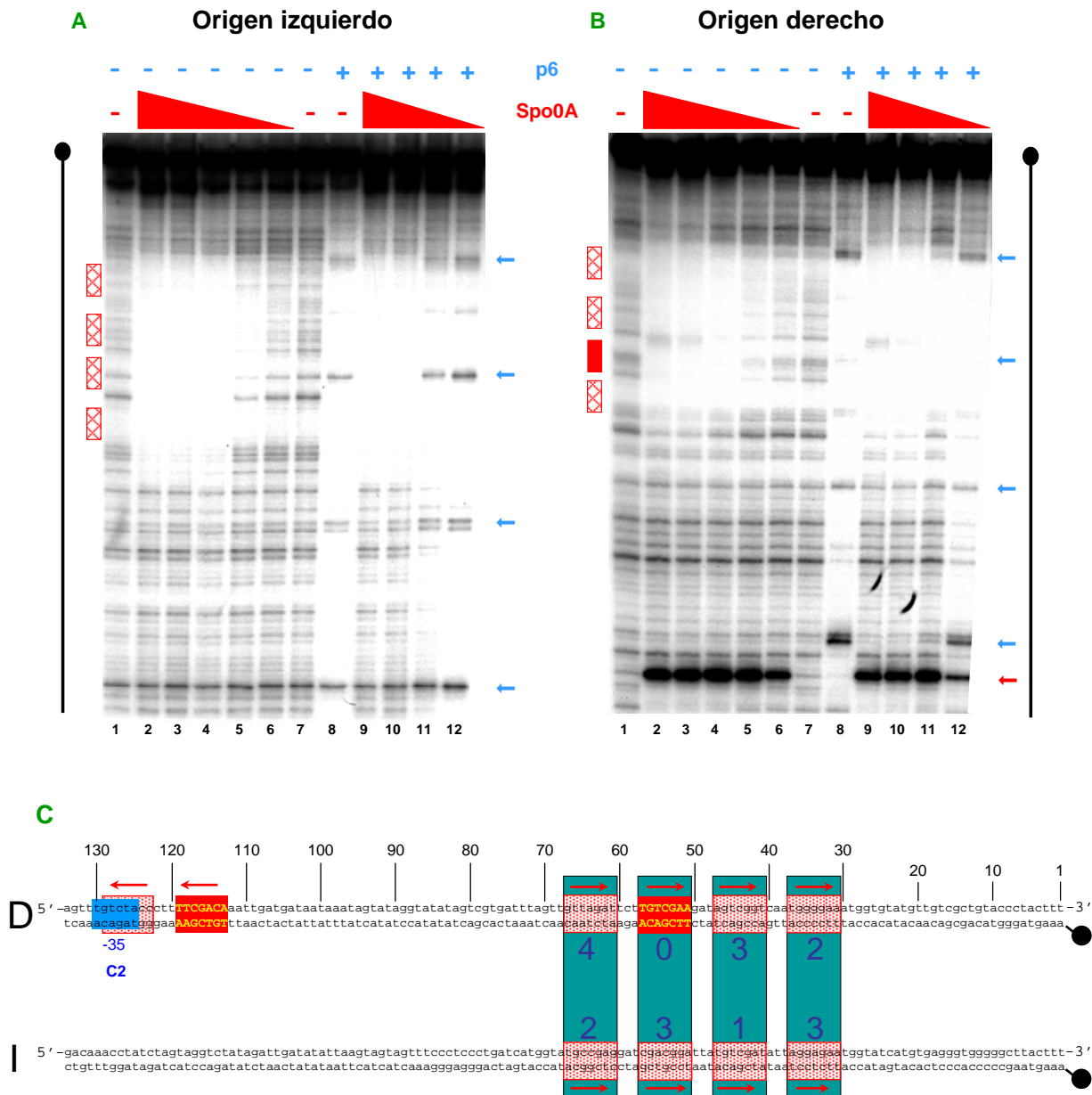


Figura 23. Spo0A previene la formación del complejo iniciador de la replicación p6-DNA en ambos extremos del DNA de ϕ 29. Análisis, mediante ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I, de la unión de Spo0A a los extremos izquierdo (**A**) y derecho (**B**) del genoma de ϕ 29 en ausencia (carriles 1 a 6) o en presencia (carriles 9 al 12) de p6. Los fragmentos utilizados, que comprenden las 202 últimas pb de cada extremo, se marcaron radiactivamente en el extremo 5' y se incubaron con las proteínas. En los carriles indicados, se añadió 1 μ g de p6 10 min después de haber añadido Spo0A. La concentración de Spo0A utilizada fue de 116 nM a 29,7 μ M, y de 464 nM a 29,7 μ M (en diluciones seriadas en pasos de 4) en **A** y **B**, respectivamente. Los rectángulos rojos a cuadros indican las posiciones de las semicajas 0A y el rectángulo rojo la caja 0A-6. Las flechas azules señalan las hipersensibilidades producidas tras la unión de p6 y la flecha roja del apartado **B** indica la hipersensibilidad producida por la unión de Spo0A a 0A-5. La parte de arriba de cada panel corresponde al final de la secuencia del genoma de ϕ 29. (**C**) Organización de las cajas y semicajas 0A en los orígenes de replicación del DNA de ϕ 29. Las cajas y semicajas 0A están indicadas mediante rectángulos rojos rellenos y punteados, respectivamente. El número de desviaciones respecto de la secuencia consenso de unión de Spo0A que presentan cada una de las semicajas se indican por encima y por debajo de las mismas. La secuencia de arriba corresponde al extremo derecho (D) y la de abajo al extremo izquierdo (I). Los círculos negros representa la TP unida a los extremos 5'. La caja perfecta del extremo derecho es la caja 0A-6. La caja -35 del promotor C2 está indicada mediante un rectángulo azul y la caja 0A-5 y la semicaja que la flanquea están indicadas mediante rectángulos rojos sin rayar y rayados, respectivamente. Los fragmentos de DNA utilizados en los ensayos del apartado **A** se amplificaron mediante PCR utilizando las parejas de oligonucleótidos Phi_Left-Phi_LL y Phi_Right-Phi_LR y usando como molde el DNA de ϕ 29.

1.5. Los sitios de unión de Spo0A del genoma de ϕ 29 presentan una afinidad relativa alta por Spo0A

Fujita et al. (2005) demostraron que las diferencias en la afinidad de unión de Spo0A *in vitro* a distintos genes está directamente relacionado con una respuesta transcripcional diferente a dosis altas o bajas de Spo0A. Los experimentos mostrados anteriormente demuestran que las (semi)cajas 0A presentes en el genoma de ϕ 29 son sitios funcionales de unión de la proteína. Sin embargo, estos resultados no dan información sobre la afinidad relativa de Spo0A por estos sitios. Por tanto, se realizó un análisis comparativo de la unión de Spo0A a sitios de unión del genoma de ϕ 29 y a los sitios de unión de los genes *abrB* y *spoIIG* de *B. subtilis*. *abrB* y *spoIIG* pertenecen a los grupos de genes que contienen sitios de unión de Spo0A de alta y baja afinidad, respectivamente (Fujita et al., 2005). Como control negativo se incluyó un fragmento de DNA de ϕ 29 que no contiene sitios de unión de Spo0A. Como se esperaba, se necesitan cantidades más bajas de Spo0A para retrasar el fragmento de DNA del gen *abrB* que para retrasar el fragmento del gen *spoIIG* y no se observa retraso del fragmento utilizado como control negativo en ninguna de las cantidades de Spo0A utilizadas (Figura 14). La unión de Spo0A a los sitios de unión asociados a los promotores A2c (0A-2) y A3 (0A-3), estaba en el mismo rango que la del gen *abrB* lo que indica que estos sitios del genoma de ϕ 29 pertenecen al grupo que presenta alta afinidad por Spo0A. Se necesita una cantidad de Spo0A más alta para observar retraso del fragmento del DNA del extremo izquierdo del genoma de ϕ 29 que para retrasar los fragmentos de los promotores de ϕ 29, pero menor que la necesaria para retrasar el

fragmento de DNA del gen de *spoIIG*. La Figura 24B muestra un gráfico donde están representadas las afinidades relativas por Spo0A de las distintas regiones analizadas mediante ensayos de retraso en gel.

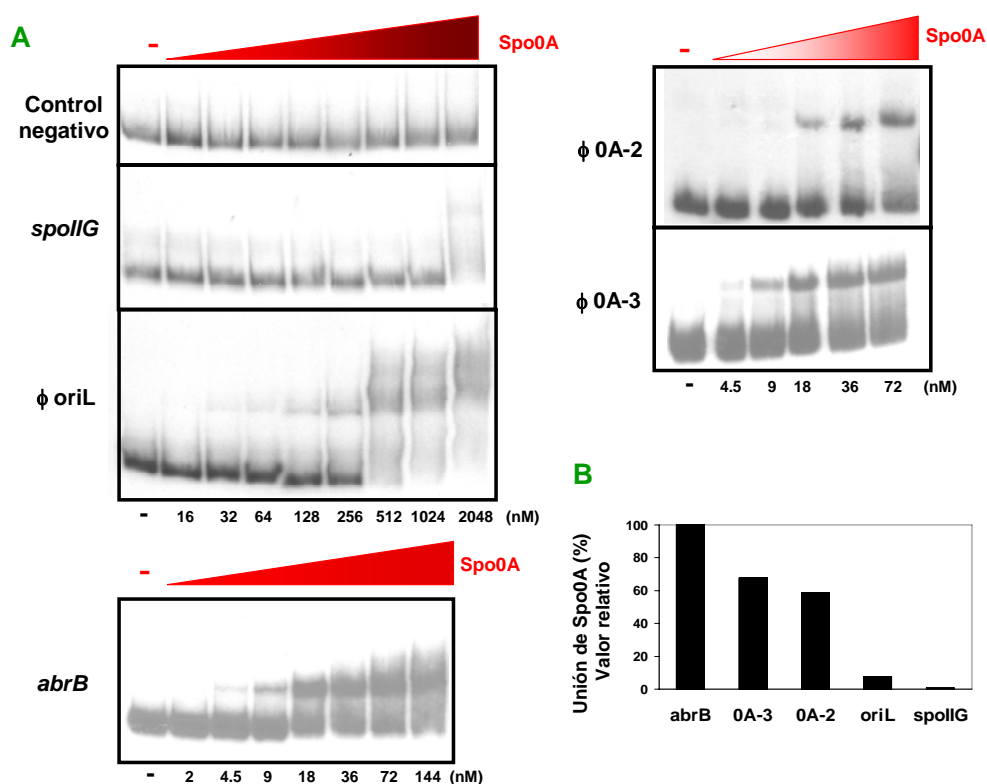


Figura 24. Análisis comparativo de la unión de Spo0A a sitios de unión del genoma de ϕ 29 y de genes de *B. subtilis* mediante ensayos de retraso en gel. Se amplificaron, mediante PCR, las distintas regiones analizadas, se marcaron radiactivamente, se incubaron con las concentraciones indicadas de Spo0A y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida. Los genes *abrB* y *spoIIG* de *B. subtilis* se utilizaron como controles ya que reflejan sitios de alta y baja afinidad, respectivamente. Las regiones de ϕ 29 analizadas corresponden a los sitios de unión de Spo0A 2 y 3, situados *upstream* de los promotores A2c y A2b, respectivamente, y la región del origen izquierdo. Se utilizó un fragmento del genoma de ϕ 29 que no posee sitios de unión de Spo0A como control negativo. **(B)** Representación gráfica de la afinidad relativa de Spo0A por los fragmentos mencionados.

1.6. Estudios *in vivo* del efecto de *spo0A* sobre el desarrollo de $\phi 29$

1.6.1. El desarrollo de $\phi 29$ es inhibido en una subpoblación de células que se encuentran en fase de crecimiento exponencial.

Para ahondar en el estudio del efecto de *spo0A* en el desarrollo de $\phi 29$ *in vivo*, se llevó a cabo un estudio comparativo del patrón de lisis de cultivos de la estirpe 168 (considerada tipo salvaje) y 168::*Δspo0A* infectados en diferentes etapas de crecimiento de las células. Se crecieron los cultivos en medio Schaeffer hasta valores de densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) de 0'3, 0'6, 0'9 y 1'4, se infectaron con $\phi 29$ a una m.o.i. de 10 y se siguió la lisis de las células a lo largo de tiempo.

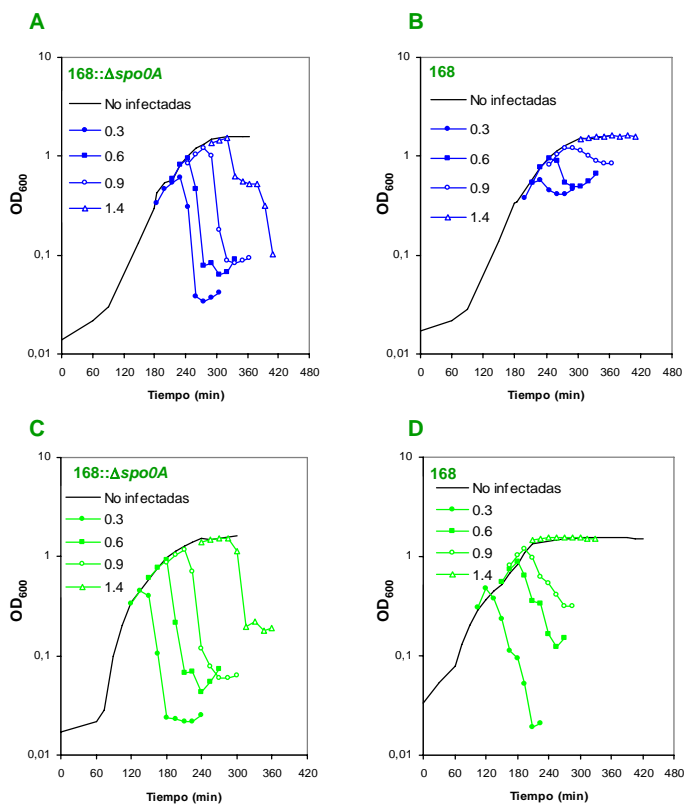


Figura 25. Patrón de lisis de cultivos de las estirpes 168 (B y D) o 168::*Δspo0A* (A y C) infectados con $\phi 29$ (A y B) o Nf (C y D) a diferentes valores de OD_{600} . Se crecieron cultivos en medio Schaeffer a 37°C y se infectaron con $\phi 29$ o Nf a valores de OD_{600} de 0'3, 0'6, 0'9 y 1'4 con una m.o.i. de 10. Se siguió la lisis midiendo la OD_{600} a los tiempos indicados posteriores a la infección. Las gráficas representan los valores medios de al menos tres experimentos.

Los resultados presentados en Figura 25A muestran que la infección de la estirpe 168::*Δspo0A* genera un patrón de lisis prácticamente total independientemente de la fase de crecimiento en la que se produce la infección. Sin embargo, como se ve en la Figura 25B, se obtiene un patrón de lisis muy diferente cuando se infectan cultivos de la estirpe wt. Cuando se infecta esta estirpe a una OD_{600} de 1,4, no se observa lisis del cultivo y se observa un patrón de lisis parcial cuando las células se infectan a valores de OD_{600} más bajos. Este inesperado patrón

de lisis parcial durante la fase de crecimiento exponencial sugiere que el desarrollo de $\phi 29$ es inhibido en una subpoblación de células en fase logarítmica de una manera dependiente de *spo0A*. Las Figuras 25C y D se explicarán más adelante (apartado 2.1.2 de Resultados).

Posteriormente se estudió si esta lisis parcial iba acompañada de una disminución en los niveles de replicación del DNA del fago. Para ello, se analizó, mediante PCR cuantitativa, la cantidad de DNA de $\phi 29$ producida en la estirpe 168 y en la estirpe 168:: $\Delta spo0A$ infectadas a una OD_{600} de 0,3 (Figura 26A). En la estirpe 168:: $\Delta spo0A$, la cantidad de DNA del fago comienza a aumentar aproximadamente a los 15 min de la infección y alcanza los niveles más altos a los 45 min. A continuación, se observa un descenso en la cantidad intracelular de DNA del fago, causado por la lisis del cultivo. Aunque se observa el mismo patrón de acumulación de DNA viral cuando se infecta la estirpe wt, los niveles máximos de DNA de $\phi 29$ obtenidos fueron alrededor de 5 veces más bajos que en la estirpe 168:: $\Delta spo0A$. La Figura 26B se explicará más adelante (apartado 2.1.3 de Resultados).

Estos resultados indican que la infección de cultivos en fase de crecimiento estacionaria provoca la inhibición, dependiente de *spo0A*, del ciclo lítico del fago en la mayor parte de las células. Sorprendentemente, el desarrollo de $\phi 29$ es también inhibido de manera dependiente de *spo0A* en una subpoblación de células durante la fase de crecimiento exponencial.

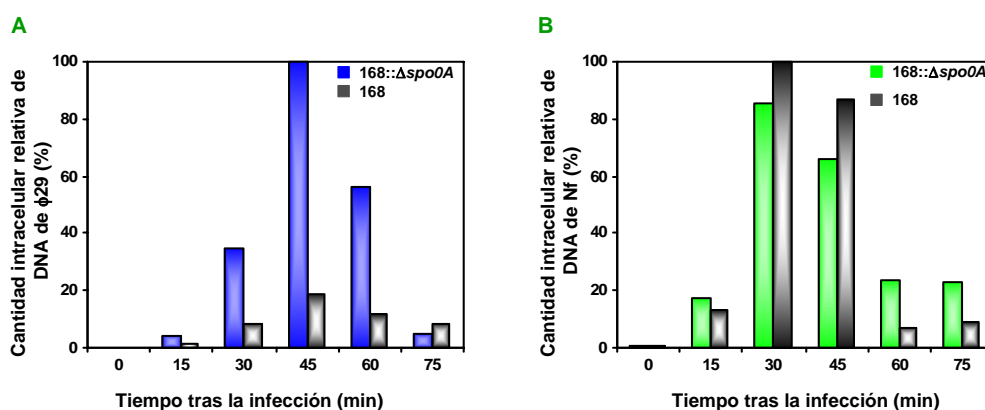


Figura 26. La replicación del DNA de $\phi 29$ es reprimida parcialmente durante la fase de crecimiento exponencial de manera dependiente de *spo0A* (A), pero no la del fago Nf (B). Se crecieron en medio Schaeffer cultivos de las estirpes de *B. subtilis* 168 y 168:: $\Delta spo0A$ y se infectaron a OD_{600} ~0,3 con $\phi 29$ o Nf a una m.o.i. de 10. A los tiempos indicados posteriores a la infección, se cuantificó la cantidad de DNA viral producida mediante PCR cuantitativa. Los resultados mostrados representan cantidades relativas de DNA de $\phi 29$ o Nf para los distintos tiempos.

1.6.2. El gen *spo0A* se expresa de forma heterogénea en células que se encuentran en fase de crecimiento exponencial

Los resultados presentados en el apartado anterior, muestran que el desarrollo de $\phi 29$ es inhibido en una subpoblación de células durante la fase de crecimiento exponencial de manera dependiente de *spo0A*. Estos resultados serían explicables si esa subpoblación produjese niveles de Spo0A activa suficientes para inhibir el desarrollo del fago. Veening et al. (2005) construyeron una estirpe isogénica de la estirpe 168 denominada 0A/IIA, que permite la visualización, mediante microscopía de fluorescencia, de la expresión de los genes *spo0A* y *spoIIA*. Esta estirpe codifica una versión mejorada de la proteína fluorescente amarilla (IYFP) bajo el control de los promotores de *spo0A* y una versión mejorada de la proteína fluorescente cian (ICFP) bajo el control del promotor *spoIIA*. La transcripción del operón *spoIIA* se activa en la fase II de la esporulación (formación del septo) y es un indicador clásico de la activación del proceso. Su activación es dependiente de σ^H -RNAP y de altos niveles de Spo0A activa (Trach et al., 1991; Chung et al., 1994; Molle et al., 2003; Fujita et al., 2005). Así, sólo las células que presenten niveles altos de Spo0A activa transcriben el operón *spoIIA*. Por tanto, en la estirpe 0A/IIA, sólo las células que presenten niveles altos de expresión de *spo0A*, por tanto altos niveles de IYFP, activarán la expresión del operón *spoIIA* (ICFP), demostrando que los niveles de transcripción de *spo0A* observados mediante fluorescencia reflejan niveles de Spo0A activa, por lo menos durante la fase de crecimiento estacionario (Veening et al., 2005). Se utilizó esta estirpe para el análisis de la expresión de *spo0A* en células individuales durante la fase de crecimiento exponencial visualizando al microscopio los niveles de fluorescencia (Figura 27). Los niveles de IYFP observados entre unas células y otras durante la fase de crecimiento logarítmico (OD_{600} 0,3) eran claramente diferentes (ver imagen B), lo cual demuestra que el gen *spo0A* presenta un patrón de expresión heterogéneo en células en crecimiento exponencial. Estos niveles de expresión eran bajos con respecto a los niveles de expresión durante la fase estacionaria ya que no activan la expresión del gen *spoIIA*, por lo que no se detecta ICFP en estas células (imagen D). Se cuantificó la intensidad de la fluorescencia de células individuales (ver Materiales y Métodos) y los valores obtenidos se muestran en la Tabla 4. Los valores de intensidad media para las células en fase de crecimiento exponencial están comprendidos entre los valores 259 y 449. Como control del experimento, se analizó también la fluorescencia producida por células crecidas hasta una hora después de la entrada en fase estacionaria (imágenes E-H) (Veening et al., 2005). En este estadio de crecimiento se observa IYFP, es decir, expresión de *spo0A* en prácticamente todas las células (imagen F), pero sólo una subpoblación de células, las que presentan niveles más altos de expresión de IYFP,

presentan también ICFP, es decir, presentan también transcripción desde el promotor *spoIIA* (ver imágenes G y H de la Figura 27).

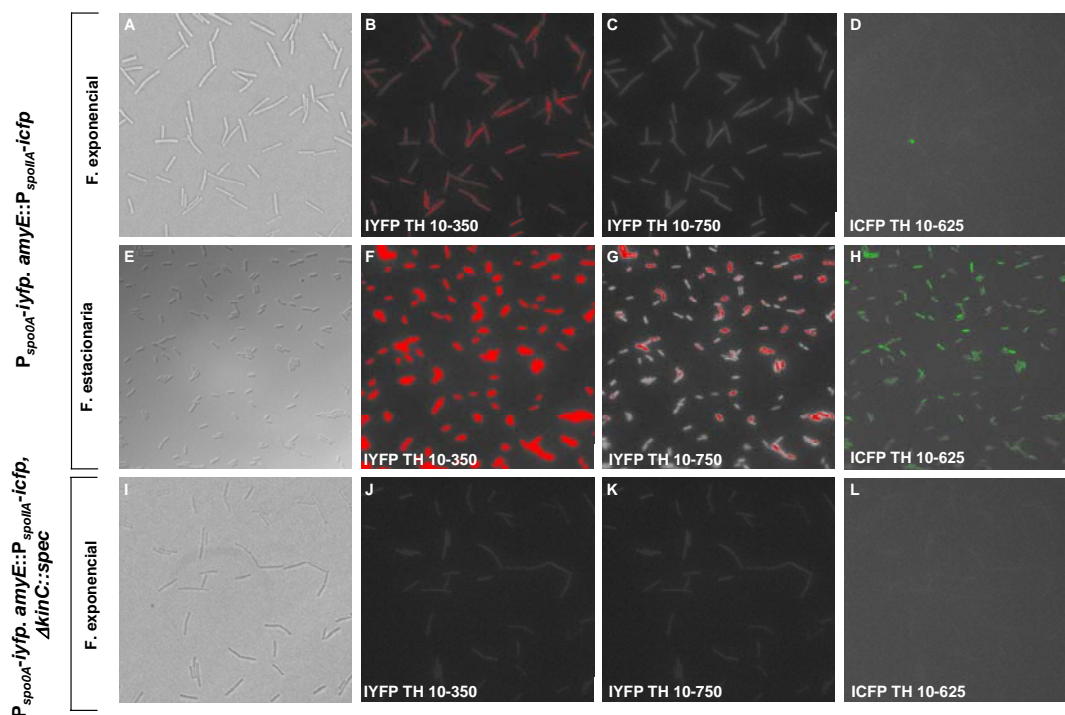


Figura 27. El gen *spo0A* se expresa de forma heterogénea durante las fases de crecimiento exponencial y estacionario. Se analizaron células de las estirpes 0A/IIA (A-H) y de la estirpe isogénica con una delección del gen *kinC* (VCLL1) (I-L) que se encontraban en la fase de crecimiento exponencial (A-D y I-L) o en la fase de crecimiento estacionario (E-H). La producción de IYFP e ICFP están bajo el control de los promotores *spo0A* y *spoIIA*, respectivamente. Las muestras, crecidas en medio Schaeffer, se visualizaron mediante contraste de fases (A, E, I) y mediante microscopía de fluorescencia (B-D, F-H, J-L). Para visualizar mejor los distintos niveles de la expresión heterogénea de IYFP (B, C, F, G, J, K) e ICFP (D, H, L) en las imágenes se han resaltado mediante color rojo (IYFP) o verde (ICFP) los valores que están por encima y por debajo del rango de valores indicado en cada imagen (aplicación de “exclusive threshold range”)

Todos estos resultados indican que *spo0A* presenta un patrón de expresión biestable en células en fase de crecimiento exponencial pero que ni siquiera los niveles más altos de expresión durante esta fase de crecimiento son suficientes para activar el promotor del gen *spoIIA*.

Tabla 4. Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de IYFP

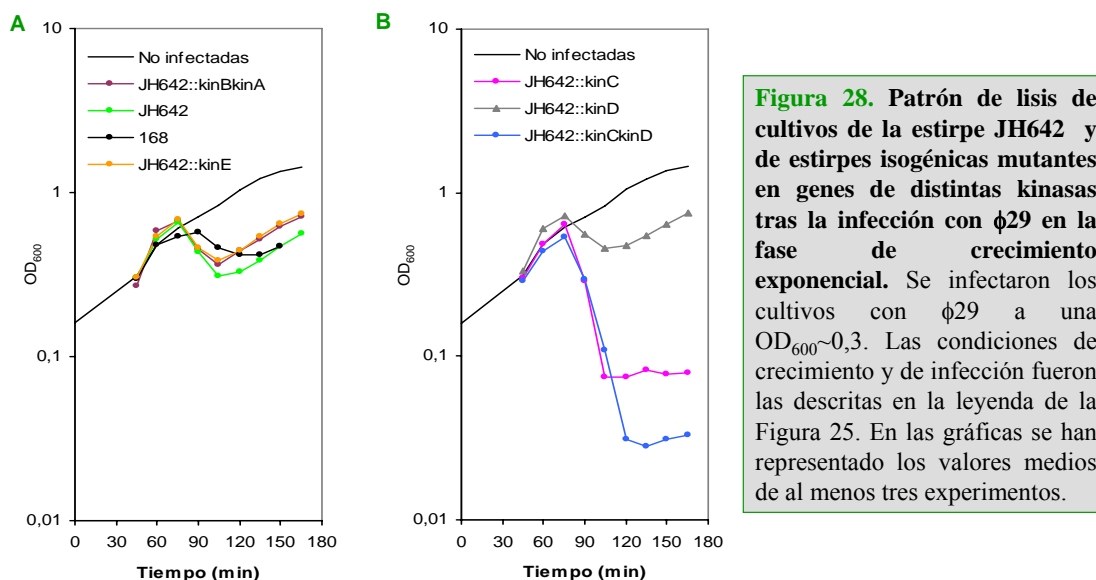
Estirpe	Fase de crecimiento	Intensidad media de fluorescencia (IYFP) ^A	
		Niveles bajos de IYFP	Niveles altos de IYFP
0A/IIA	Exponencial	259 (\pm 30)	449 (\pm 102)
VCLL1 (=spo0A/IIA, Δ kinC)	Exponencial	205 (\pm 14)	254 (\pm 9)

^A: Las imágenes de IYFP fueron tomadas bajo las mismas condiciones para todas las muestras. Para cada imagen, las células se dividieron en dos grupos: células con bajos niveles de IYFP y células con altos niveles de IYFP. A continuación, se cuantificó la intensidad de fluorescencia de al menos 150 células de cada grupo usando las mismas condiciones. Las imágenes utilizadas provienen de al menos tres experimentos independientes.

1.6.3. Efecto de mutaciones en los genes de quinasas de la cascada de fosfatos de activación de Spo0A sobre la lisis parcial producida por ϕ 29 en células en fase de crecimiento exponencial

A continuación nos preguntamos si el patrón de lisis parcial que genera ϕ 29 en un cultivo en fase logarítmica dependía de una o varias de las quinasas encargadas de transferir los grupos fosforilos a la cascada de fosfatos que lleva a la activación de Spo0A (ver Introducción, apartado 1.3). Estos experimentos se llevaron a cabo utilizando una serie de estirpes isogénicas mutantes en genes de las distintas quinasas y cuya estirpe parental es la denominada JH642, que es un derivado de la estirpe 168 (Hamon and Lazazzera, 2001). La estirpe parental JH642 presenta un comportamiento muy similar al de la estirpe 168, es decir, la infección con ϕ 29 de cultivos de la estirpe JH642 que se encuentran en la fase de crecimiento exponencial también genera un patrón de lisis parcial (Figura 28A). Un patrón de lisis parcial similar se observó cuando se infectaba un cultivo logarítmico de una estirpe que posee una delección en los genes *kinA* y *kinB* (JH642:: Δ kinA Δ kinB) y en una estirpe con una delección en el gen *kinE* (JH642:: Δ kinE). Sin embargo, cultivos logarítmicos de la estirpe delecionada en el gen *kinC* (JH642:: Δ kinC), infectados con ϕ 29, generaban un patrón de lisis casi total. Al igual que la estirpe JH642, la estirpe isogénica delecionada en el gen *kinD* (JH642:: Δ kinD), daba lugar a una lisis parcial, aunque, en algunos ensayos, se observó una lisis más pronunciada (resultados no mostrados). Por el momento no sabemos qué provoca estas fluctuaciones en el comportamiento a nivel de lisis de este mutante, pero como se observa en la Figura 28B, un doble mutante *kinC kinD* (JH642:: Δ kinC Δ kinD), genera un patrón de lisis más pronunciado que la estirpe JH642:: Δ kinC y muy similar al de la estirpe 168:: Δ spo0A. Estos resultados sugieren que la

existencia de una población resistente a la lisis por $\phi 29$ es dependiente de Spo0A y en último término de KinC y, aunque en menor medida, de KinD.



1.6.4. La ausencia de *kinC* provoca una bajada en los niveles de expresión de *spo0A* durante la fase de crecimiento exponencial

Para estudiar si la ausencia de KinC afecta a la generación del patrón de expresión heterogénea de *spo0A* en células logarítmicas, se deletó el gen *kinC* en la estirpe 0A/IIA (0A/IIA:: $\Delta kinC$). Al visualizar células de esta estirpe al microscopio, se observa que los niveles de expresión de IYFP son más bajos y uniformes en comparación con los niveles que se observan en la estirpe que contiene el gen *kinC* intacto (comparar imágenes B y J de la Figura 27). Este resultado se confirmó cuantificando los niveles de fluorescencia de células individuales (Tabla 4). Mientras que los niveles de intensidad media de la estirpe 0A/IIA:: $\Delta kinC$ se encuentran dentro del rango 205-254, las células de la estirpe que contiene el gen *kinC* intacto, presentan unos niveles de intensidad de fluorescencia media comprendidos entre los valores 259 y 449.

En conjunto estos resultados indican fuertemente que KinC y, probablemente, en menor medida KinD, son responsables de la generación de niveles de Spo0A activa en una subpoblación de células en fase logarítmica que causan la supresión del desarrollo del bacteriófago $\phi 29$, pero que son insuficientes para activar la expresión de genes de esporulación tempranos.

2. Papel de SpoOA sobre el desarrollo del bacteriófago Nf perteneciente al grupo 2 de la familia de fagos de $\phi 29$

2.1. Estudios *in vivo*

2.1.1. Al contrario que $\phi 29$, el bacteriófago Nf produce placas de lisis visibles en la estirpe 168 de *B. subtilis*

En conjunto, los resultados mostrados en el apartado 1 demuestran que la proteína Spo0A es la responsable de la supresión del ciclo lítico de $\phi 29$ necesaria para el desarrollo de la estrategia de infección alternativa. Spo0A inhibe el desarrollo del ciclo lítico tanto a nivel de la transcripción como a nivel de la replicación. Además, los niveles de Spo0A necesarios para reprimir el ciclo lítico del fago son más bajos que los que se necesitan para activar los genes tempranos de esporulación. Como se explica en detalle en el apartado 2.1 de la Introducción, $\phi 29$ pertenece a una familia de fagos que está dividida en tres grupos. Todos los miembros de los grupos 1 y 2 infectan *B. subtilis*. Nos planteamos si la supresión del desarrollo del fago mediada por Spo0A está conservada en los fagos pertenecientes al grupo 2, en concreto, si está conservada en el bacteriófago Nf.

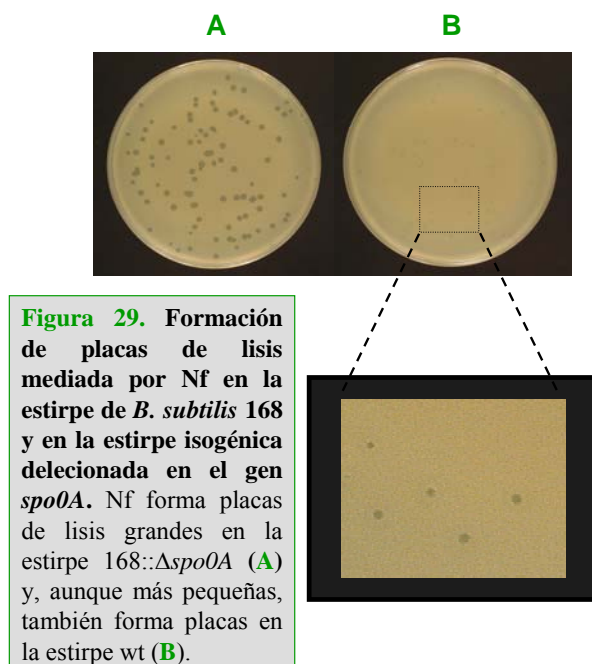


Figura 29. Formación de placas de lisis mediada por Nf en la estirpe de *B. subtilis* 168 y en la estirpe isogénica delecionada en el gen *spo0A*. Nf forma placas de lisis grandes en la estirpe 168:: $\Delta spo0A$ (A) y, aunque más pequeñas, también forma placas en la estirpe wt (B).

Como se ha mostrado en el apartado 1.3 de Resultados, $\phi 29$ forma placas de lisis grandes en la estirpe 168:: $\Delta spo0A$. Sin embargo, no forma placas de lisis o si las forma, apenas son visibles, en la estirpe wt. Este ensayo cualitativo se utilizó como primera aproximación al estudio de posibles diferencias entre $\phi 29$ y Nf en cuanto a la supresión de su ciclo lítico de manera dependiente de *spo0A*. En la Figura 29 se puede ver que Nf forma placas de lisis grandes sobre un césped de bacterias de la estirpe 168:: $\Delta spo0A$. Pero, al

contrario que $\phi 29$, Nf es capaz también de formar placas de lisis en la estirpe 168, aunque estas placas son de menor tamaño que las que genera en la estirpe 168:: $\Delta spo0A$. Estos resultados indican que, aunque el desarrollo del ciclo lítico de ambos fagos está suprimido en presencia de *spo0A*, la supresión del desarrollo de Nf es más leve que la de $\phi 29$.

2.1.2. El desarrollo y la replicación del DNA del fago Nf son inhibidos en menor extensión que los de ϕ 29 cuando se infectan células en fase de crecimiento exponencial

Para estudiar con más detalle el comportamiento diferente de ϕ 29 y Nf, se comparó el patrón de lisis generado tras la infección de cultivos de las estirpes 168 y 168:: $\Delta spo0A$. Así, se infectaron cultivos de ambas estirpes en diferentes estadios de crecimiento con cada uno de los fagos a una m.o.i. de 10 y se siguió el nivel de lisis a lo largo del tiempo. Los resultados presentados en la Figura 25 muestran que la infección de la estirpe 168:: $\Delta spo0A$ genera un patrón de lisis total independientemente del fago con el que se haya infectado (Figura 25A y C). Como ya se ha comentado en el apartado 1.4.1 de Resultados, la infección con ϕ 29 de la estirpe 168 genera un patrón de lisis muy diferente (Figura 25B). En esta estirpe no se observa lisis en cultivos infectados a una OD_{600} de 1,4 y se observa una lisis parcial en cultivos infectados a valores de OD_{600} más bajos. En el caso de Nf (Figura 25D), tampoco se observa lisis si se infectan células de la estirpe 168 a una OD_{600} de 1,4, lo que sugiere que en esta etapa del crecimiento se produce una supresión del desarrollo de ambos fagos en la mayor parte de las células. No obstante, al contrario de lo que ocurre tras la infección con ϕ 29, la infección con Nf de células de la estirpe 168 en fase de crecimiento exponencial provoca una lisis casi total del cultivo. De hecho, el patrón de lisis casi total que se observa cuando se infectan células de la estirpe 168 que están en la fase de crecimiento exponencial es muy similar al observado en células de la estirpe 168:: $\Delta spo0A$ infectadas en la misma fase de crecimiento. Estos resultados muestran que, aunque el desarrollo del ciclo lítico de Nf es también inhibido de una manera dependiente de $spo0A$ en células en fase de crecimiento estacionario, el desarrollo del fago no es inhibido, o por lo menos es inhibido de una manera menos drástica, que el desarrollo de ϕ 29 cuando se infectan células en la fase de crecimiento exponencial.

A continuación, estudiamos si las diferencias observadas entre los dos fagos a nivel de lisis durante la fase de crecimiento exponencial se reflejaban también en diferencias en los niveles de replicación del DNA de ambos fagos. Para ello se compararon las cantidades producidas de DNA de cada uno de los fagos en células infectadas a una OD_{600} de 0,3 en las estirpes 168 y 168:: $\Delta spo0A$ (Figura 26). Como se esperaba, en la estirpe 168:: $\Delta spo0A$, la cantidad de DNA de ambos fagos comienza a aumentar alrededor de 15 min después de la infección, alcanza los niveles más altos aproximadamente a los 30 min para Nf y a los 45 min para ϕ 29 y a continuación caen los niveles debido a la lisis de las células. Como ya se ha comentado, en el caso de la infección con ϕ 29, la cantidad de DNA viral es aproximadamente cinco veces más baja cuando se infectan células de la estirpe 168 en comparación con las

cantidades que se obtienen cuando se infecta la estirpe 168::*Δspo0A*. Sin embargo, como se ve la Figura 26B, esta bajada en la cantidad de DNA viral producido no se observa cuando se infectan con Nf células de la estirpe wt.

En resumen, estos resultados demuestran que $\phi 29$ y Nf se comportan de forma diferente durante la infección de células 168 en fase exponencial. Mientras que la infección con $\phi 29$ genera un patrón de lisis parcial que va acompañado de una caída en los niveles de replicación del genoma del fago, estos efectos dependientes de *spo0A* no se observan, o son mucho más leves, tras la infección con el fago Nf.

2.1.3. La replicación del genoma de Nf es inhibida en menor extensión que la de $\phi 29$ en células infectadas durante la fase de crecimiento estacionario

Como se ha mencionado en el apartado anterior, no se produce lisis en células de la estirpe 168 infectadas con $\phi 29$ o Nf durante la fase de crecimiento estacionaria ($OD_{600}=1,4$). La lisis de una célula requiere la síntesis de las proteínas virales p14 (holina) y p15 (lisozima) cuyos genes se localizan en el operón tardío. Los genes que codifican a las proteínas implicadas en la replicación del genoma se localizan en los operones tempranos (ver apartado 2.1 de Resultados). Por tanto, esta separación en operones podría permitir que el genoma del fago se estuviese replicando sin que se produjese la lisis de las células. Esta posibilidad se estudió mediante el uso de PCR cuantitativa para medir la cantidad producida de DNA de ambos fagos en células de la estirpe 168 infectadas a una OD_{600} de 1,4. La Figura 30 muestra que los niveles de DNA de $\phi 29$ acumulados en estas condiciones son mucho más bajos que los de Nf. Así, aunque la infección con cada uno de los fagos de células de la estirpe 168 durante la fase estacionaria no da lugar a la lisis del cultivo, sí se observa replicación del genoma de Nf. Esto demuestra que, durante la fase de crecimiento estacionario, la replicación del DNA del bacteriófago Nf es inhibida en menor extensión que la de $\phi 29$.

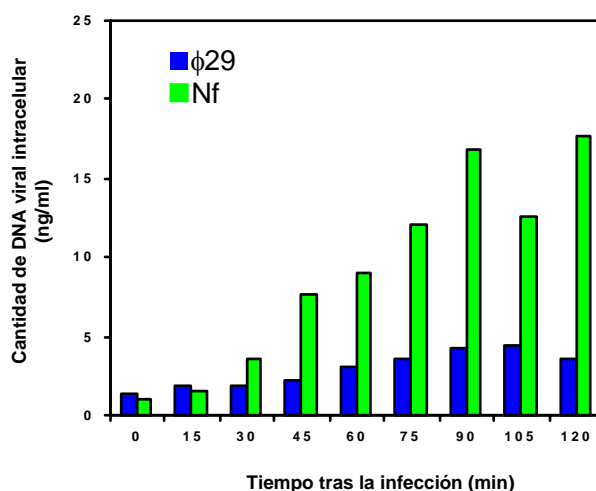


Figura 30. La replicación de Nf es inhibida en menor extensión que la de φ29 durante la fase de crecimiento estacionaria. Se crecieron en medio Schaeffer cultivos de la estirpe de *B. subtilis* 168 y se infectaron a $OD_{600} \sim 1,4$ con φ29 o Nf a una m.o.i. de 10. A los tiempos indicados posteriores a la infección, se cuantificó la cantidad de DNA viral producida mediante PCR cuantitativa. Los resultados mostrados representan ng de DNA de φ29 o Nf producidos por ml de cultivo.

2.2. Secuenciación del genoma de Nf y comparación con el de φ29

Se conoce la secuencia completa del DNA de φ29, que contiene 19.285 pb (Yoshikawa and Ito, 1982; Vlcek and Paces, 1986; Garvey et al., 1986). Sin embargo, sólo se conocía la secuencia de algunas regiones del genoma de Nf (Yoshikawa et al., 1985; Mizukami et al., 1986; Leavitt and Ito, 1987; Nuez and Salas, 1993; Gascón et al., 2000). Con el objetivo de hacer un análisis comparativo del DNA de ambos fagos y tratar de explicar las diferencias de comportamiento observadas, se llevó a cabo la secuenciación del genoma completo del bacteriófago Nf.

El tamaño de la secuencia del DNA de Nf es de 18.735 pb, 532 pb menor que la de φ29 (19.285 pb). Los genomas de ambos fagos presentan un contenido en bases G + C muy similar (37,3% para Nf y 40% para φ29). Al nivel de nucleótidos, la identidad entre ambos genomas es de un 64%. Se llevó a cabo un análisis manual y computerizado de la secuencia del genoma de Nf para identificar fases de lectura abiertas y otras características. La secuencia de aminoácidos deducida codificada por las distintas fases de lectura abierta (ORF) identificadas han sido comparadas con las secuencias de las proteínas de φ29 y con las secuencias de proteínas disponibles en los bancos de datos. En los casos en los que la secuencia de aminoácidos deducida de las fases de lectura abierta o de los genes presentaron una homología significativa, se denominaron con la nomenclatura correspondiente. El resto de las fases de lectura abierta se

denominaron mediante el uso de letras. La Tabla 5 presenta una panorámica de las características de las fases de lectura abierta o genes de Nf y el nivel de homología obtenido de la comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas con las ya conocidas del fago $\phi 29$. Los detalles sobre los sitios de iniciación de la traducción de los genes y las fases de lectura abierta de Nf se presentan en la Tabla 6.

Tabla 5. Características de los genes y de las fases de lectura abierta de Nf

Gen/ORF	Función del (posible) producto del gen	Nº de aminoácidos (Nf/ $\phi 29$)	Peso Molecular en kDa (Nf/ $\phi 29$)	Identidad/similitud con su equivalente en $\phi 29$ ^A (%)
ORF-1B (=ORFJ)	?	58/58	6,9/6,8	51,7/68,9
Gen 56	Inhibidor de la Uracil-DNA glucosilasa (UDG)	56/56	6,6/6,6	58,9/71,4
ORF-h (gen 1) ^B	Asociación de la replicación del DNA a la membrana	67/86	7,9/9,9	33,9/58,9
ORF-g	?	36/--	4,1/--	----
Gen 2	DNA polimerasa	572/572	66,5/66,3	82/88
Gen 3	Proteína terminal	266/266	31,2/31,0	62/74
Gen 4	Regulador transcripcional	125/125	14,9/15,1	78/84
Gen 5	SSB	122/124	13,1/13,3	63/72
Gen 6	DBP; iniciador de la replicación del DNA, regulador transcripcional	100/104	11,3/12,0	44/59
Gen 7	Proteína de andamiaje	101/98	11,8/11,3	61,4/72,3
Gen 8	Proteína mayoritaria de la cabeza del fago	449/448	49,7/49,8	79,7/89,5
Gen 8.5	Proteína de la fibra de la cabeza	257/280	27,6/29,5	42,4/56,0
Gen 9	Proteína de la cola	598/599	67,4/67,6	64,5/75,3
Gen 10	Conector (cuello/collar superior)	308/309	35,6/35,9	76,9/84,7
Gen 11	Collar/cuello inferior	304/304	34,8/35,2	68,1/77,6
Gen 12	Proteína del apéndice del pre-cuello	861/854	92,0/92,1	69,6/79,2
Gen 13	Morfogénesis	363/365	40,7/40,9	76,0/83,47
Gen 14	Holina	132/134	15,1/15,3	71,2/84,1
Gen 15	Hidrolasa del peptidoglicano	262/258	29,2/28,1	66,8/73,3
Gen 16	Encapsidación del DNA, ATPasa	332/332	39,0/39,0	77,1/86,1
ORF-16.5	?	35/37	4,2/4,6	34,3/54,3
ORF-e	?	19/--	--/--	----
ORF-16.6	?	53/54	6,0/6,2	20,7/30,2
Gen 16.7	Organizador de la replicación del DNA, implicado en la inyección del DNA	130/130	15,5/15,2	52,3/69,2
ORF-16.8	?	97/105	11,5/12,4	21,6/30,9
ORF-16.9	?	98/108	11,4/12,6	18,4/31,6
Gen 17	Implicado en la inyección del DNA del fago y en la replicación del DNA	129/166	14,9/19,2	24,0/42,6

^A: Para calcular el porcentaje de similitud se consideraron conservativos los siguientes aminoácidos: L, I, V y M; F y Y; K y R; D y E; Q y N; y A, S y T.

^B: La secuencia proteica deducida de la ORF-h (67 aminoácidos), presenta una homología significativa con la secuencia proteica deducida del gen 1 de $\phi 29$ (86 aminoácidos), excepto por una deleción que corresponde a los aminoácidos del 10 al 33 de p1 de $\phi 29$. En este caso, los valores calculados de identidad/similitud se refieren a los 56 residuos terminales del dominio C-terminal.

Tabla 6. Posibles sitios de iniciación de la traducción de los genes y ORF de Nf			
Gen/ORF	TC ^A	Posibles sitios de iniciación de la traducción ^B	Espaciador ^C
ORF-j	+	TTAAACTGAATCTGGTCAAAGAAAT ATG	10
Gen 56	-	TTATTTGGTGTAGAGGTCAAAGCAA ATG	12
ORF-h (gen 1)	+	AGACAAATAAACGAGGTGAAAAGTA ATG	12
ORF-g	-	ACGTTTGTTTAAGGGAGTATGAGAA ATG	10
Gen 2	-	AGCACCGTTGAAGGGTTGAAAGTAT ATG	14
Gen 3	-	CGTGGTTAAAGGGGTGTAACACAAC GTG	13
Gen 4	-	TGTGGGATAATGGAGGTAATATAG ATG	12
Gen 5	-	AAACGAAAAGAAAAGGATGATTACA ATG	9
Gen 6	-	AGAAGGAAAAGGAGAGAAGGAAAAT ATG	13
Gen 7	-	AATCTATTGAAAGGAGATGGGCTAT ATG	11
Gen 8	-	AATAGAAGAAACGAGGAATTAAAAC ATG	12
Gen 8.5	+	CATCTTCTGGAGGTGCGCAAGCGTA ATG	15
Gen 9	-	TTACATTCTATAGAGGTGAAATTTTC ATG	12
Gen 10	+	ACACGCTAAATAACGAGGTGATATA ATG	10
Gen 11	-	AGATTAAACGCTCAGGAAACAGAAA ATG	9
Gen 12	-	GTTGGTGTACTAAGGAGGGAAAACC ATG	10
Gen 13	-	GTGTTACTGAAATAGGGGTGTTGAT ATG	10
Gen 14_1	-	CGACATAGTAAAGGAGATAAAAAGGG ATG	11
Gen 14_2^E	-	AAAGGAGATAAAAAGGGATGATGAAT ATG	9
Gen 15	+ ^D	AGAAAAGATAAAGGAGATAAATAAT ATG	11
Gen 16	-	AGACTTAAATAGAAGGTGAAAAGCT GTG	12
ORF-16.5	+ ^D	ATCAAACCTTTGAGGAGGAAATAAG ATG	10
ORF-e	-	GCCAAATACACAGGACTTGAAGGTG ATG	11
ORF-16.6	+	AAAAGCTTTACAAAGGAGTGTAAA ATG	9
Gen 16.7	-	CAAGATAACGAAAGAGGTAAAAAG ATG	10
ORF-16.8	-	AATCGAGAGAAGGAGGATAACAAAG ATG	12
ORF-16.9	-	GAAGACATAATTGGAGGTTACAAATA ATG	12
Gen 17	-	TAGATACAATGAGAGGATGAACAAG ATG	9

^A TC, Acomplamiento traslacional por solapamiento del codón de parada del gen u ORF situado *upstream*, con el codón de iniciación del siguiente gen u ORF.

^B Está indicada la secuencia del posible codón de iniciación y de los 25 nucleótidos situados *upstream*; aparecen subrayados los nucleótidos complementarios a la parte final de la secuencia de la subunidad 16S del rRNA de *B. subtilis* en dirección 3' (UCUUUCCUCCACUAG) 5' (Moran et al., 1982).

^C El espaciador define la distancia (en número de bases) desde la primera base situada a la derecha de la secuencia 5'-AGAAAGGA-3' (o su equivalente) hasta la base adyacente al codón de iniciación.

^D El codón de iniciación y el codón de parada están separados por 1 pb.

^E El gen 14 de Nf, como otros genes que codifican a holinas, contiene dos posibles codones de iniciación (posiciones 1 y 3) y cada una contiene un posible sitio de unión del ribosoma a una distancia adecuada. Esto podría provocar la síntesis de dos proteínas que diferirían en su dominio N-terminal. En el caso de ϕ 29 se ha demostrado que las dos versiones de la holina que se sintetizan actúan de forma cooperativa para provocar la lisis (Tedin et al., 1995).

Todos estos datos han permitido construir un mapa genético y transcripcional del genoma de Nf que se muestra, junto con el de ϕ 29, en la Figura 31. En la figura se puede ver que ambos genomas presentan una organización similar. En ambos casos, los genes y las fases de lectura abierta están localizados en un operón central tardío flanqueado a ambos lados por un operón temprano. Además, los dos genomas presentan en el extremo izquierdo una secuencia que

codifica al pRNA, implicado en el empaquetamiento del DNA en la cabeza del fago. El operón tardío codifica a las proteínas estructurales del fago, a las proteínas implicadas en la morfogénesis del fago, a las implicadas en el empaquetamiento del fago y a las implicadas en la lisis de la célula infectada. El operón temprano localizado en el extremo izquierdo del genoma contiene los genes 6, 5, 3 y 2, que codifican a las proteínas esenciales para la replicación del DNA del fago, el gen 4, que codifica a la proteína responsable de la regulación de la transcripción, y el gen 56, cuyo producto posiblemente sea un homólogo de la proteína p56 de $\phi 29$, que es un inhibidor de la Uracil-DNA Glucosilasa de *B. subtilis* (Serrano-Heras et al., 2007). Este operón temprano de Nf contiene además, tres fases de lectura abierta denominadas g, h y j. La secuencia de aminoácidos deducida de la fase de lectura abierta h (67 aa), presenta una homología significativa con la secuencia de la proteína p1 de $\phi 29$ (86 aa) excepto que posee una delección de 19 aminoácidos que corresponden a los aminoácidos 10 a 33 de la p1 de $\phi 29$. La fase de lectura abierta j de Nf y la fase de lectura abierta 1B de $\phi 29$ probablemente codifiquen a proteínas homólogas, aunque nada se sabe de su función. La fase de lectura abierta g no está presente en el genoma de $\phi 29$. El análisis de su secuencia (36 aa) sugiere que contiene un dominio transmembrana entre los aminoácidos 5 a 24. Finalmente, el genoma de Nf carece de un homólogo de la fase de lectura abierta 1C de $\phi 29$ y carece también del extremo 5' del promotor A1 (caja -35 y secuencias *upstream*). Esta parte del promotor A1, en Nf está localizada en el extremo 3' de la secuencia de la fase de lectura abierta j.

El operón temprano de Nf localizado en el extremo derecho del genoma contiene 7 fases de lectura abierta. En base a homología de secuencia con $\phi 29$, el producto de los posibles genes 16.7 y 17 de Nf podrían estar involucrados en la internalización del genoma del fago durante las primeras etapas de la infección y en la asociación de la replicación del DNA viral a la membrana de la bacteria. De hecho, está demostrado que el gen 16.7 de Nf codifica a una proteína de tamaño similar al de la proteína p16.7 de $\phi 29$ (Meijer et al., 2001b). La función de los posibles productos de las fases de lectura abierta 16.9, 16.8, 16.6 y 16.5, cuyas fases de lectura abierta están presentes en el genoma de $\phi 29$, son aún desconocidas, así como tampoco se conoce la función de la fase de lectura abierta e, que no aparece en la secuencia de DNA de $\phi 29$.

Los promotores del genoma de Nf localizados antes de los operones tempranos y antes del operón tardío, así como los promotores que preceden a la secuencia del pRNA, son similares a los de $\phi 29$ y se han denominado usando la misma nomenclatura. En la Tabla 7 se presenta un alineamiento de los promotores de ambos fagos. Todos ellos son reconocidos por σ^A -RNAP y la mayoría pertenecen al grupo de promotores denominado “promotores con caja -10 extendida”. El promotor A1, que es el responsable de la síntesis del pRNA, presenta las cajas -10 y -35 consenso para ser reconocido por σ^A -RNAP. Los promotores responsables de la transcripción

del operón temprano del extremo izquierdo, A2b y A2c, y del operón tardío, A3, están situados en la región intergénica que separa ambos operones. Los promotores A2b y A2c están organizados en tandem y el promotor A3 está orientado en dirección contraria a los anteriores. Como ya se ha comentado, el mecanismo regulador del cambio de transcripción temprana a tardía en $\phi 29$ ha sido ampliamente estudiado (revisado en, Rojo et al., 1998; Meijer et al., 2001a).

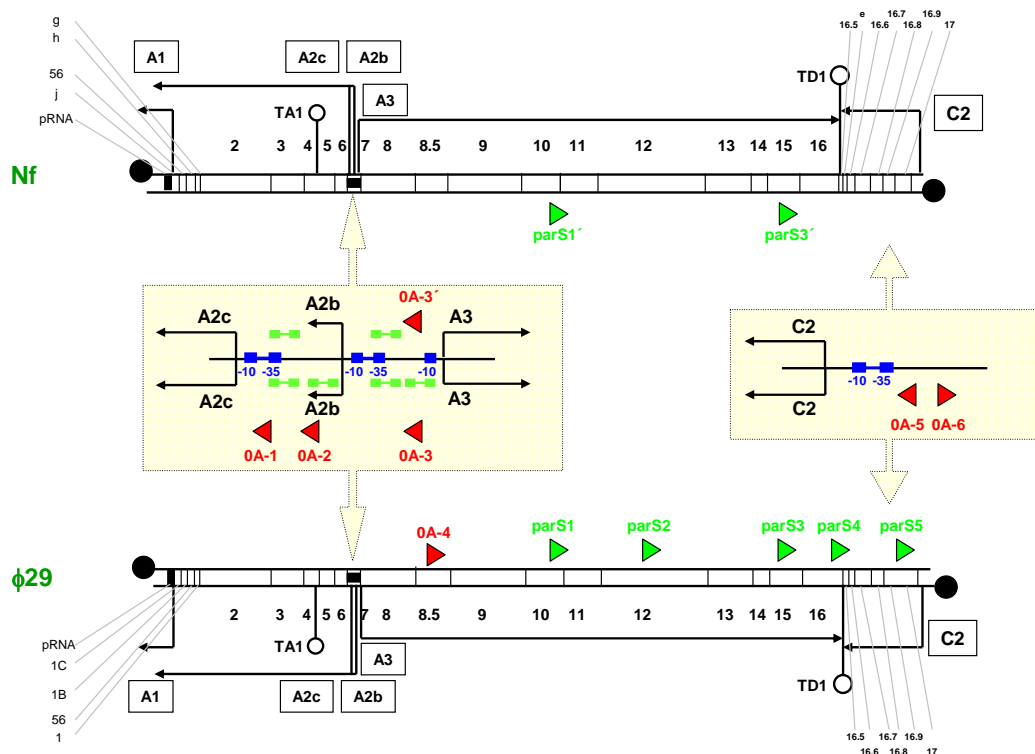


Figura 31. Comparación de los mapas genéticos y transcripcionales de los genomas de Nf y $\phi 29$. El tamaño de los transcritos y la dirección de la transcripción se indica mediante flechas. La posición de los genes y de las fases de lectura abierta se indican mediante números. Las fases de lectura abierta que sólo aparecen en el genoma de Nf están indicadas con letras minúsculas. Los nombres de los promotores tempranos (A1, A2b, A2c, C1 y C2) y del promotor tardío (A3) aparecen recuadrados. Los terminadores están indicados mediante horquillas. Los círculos negros representan la proteína terminal unida a los extremos 5' y las cajas negras cerca de los extremos representan la región que codifica para el pRNA. Los triángulos verdes indican la posición de los sitios *parS*. La parte central de la figura representa un aumento de la región intergénica de los promotores A2c-A3 y de la región del promotor C2 de ambos fagos. La parte de arriba corresponde al genoma de Nf y la de abajo al de $\phi 29$. Los rectángulos azules representan las cajas -10 y -35 de los promotores. Los sitios de inicio de la transcripción están indicados mediante flechas curvadas. Los triángulos rojos representan las cajas OA y los rectángulos verdes, los sitios de unión de p4.

Recientemente, se ha descrito que, en líneas generales, el mecanismo de cambio de transcripción temprana a tardía es similar en el bacteriófago Nf (Pérez-Lago et al., 2005b). La transición de transcripción temprana a tardía es regulada, al igual que en $\phi 29$, por las proteínas virales p4 y p6. La región intergénica donde se localizan los promotores tempranos A2b y A2c y

el promotor tardío A3, presenta sitios de unión para la proteína p4, pero en lugar de los cuatro sitios que aparecen en el genoma de $\phi 29$, el genoma de Nf sólo presenta dos sitios de unión de p4, equivalentes a los sitios 1 y 3 del genoma de $\phi 29$. Así, el sitio 1 solapa con el promotor A2c y el denominado sitio 3 solapa parcialmente con el promotor A2b. La proteína p6 estimula la unión de p4 a estos sitios uniéndose a la región intermedia. En esta situación, se reprime la transcripción desde los promotores A2b y A2c debido a que se impide el acceso de la RNAP y se activa la transcripción del promotor tardío A3, que al igual que en $\phi 29$, carece de caja -35. La proteína p4 de Nf recluta la RNAP al promotor A3 (Nuez and Salas, 1993).

Tabla 7. Alineamiento de los principales promotores de Nf y $\phi 29$

Promotor	Fago	Secuencia (5' - 3')			Espaciador	TGN -10	Expresión
		-35	Espaciador	-10			
A1	Nf	CGATATTTGACA	TTTGATAGAATTTATGG	TATAAATGTCATAGACAA	17	+	Constitutiva pRNA
	$\phi 29$	TTAATGTTGACA	ACTATTACAGAGTATGC	TATAATGGTAGTATCAAT	17	+	
A1 IV	$\phi 29$	ACATGATTGATA	TATGTTTAGGCTACAAAGGGAACGTAAGATACATAC		-	-	Temprana
A2c	Nf	AATATGTTGAAA	AATGTTGAACAGCATGA	TATACTAAAAGAGTAGTA	17	+	Temprana izquierdo
	$\phi 29$	AAAGTGTGAAA	ATTGTCGAACAGGGTGA	TATAAATAAAGAGTAGAA	17	+	
A2b	Nf	AAAAGCTTGCAAT	TTTGTTTAACATCACCT	TAGAATAATGAGTGTAGC	17	-	Temprano izquierdo
	$\phi 29$	AAAGTCTTGCAA	AAAGTTATACAGGTGTGG	TTAAATAGAGAACGTAGA	18	+	
A3	Nf	ATAACACCATGAATACCAAGGGTTCCGTGA	TATAAATAAATAGTAATA		--	+	Operón tardío
	$\phi 29$	ACAAATCCTTATGTATCAAGGGTTCACGTGG	TATAAATTAAGTAGTACTA		--	+	
C1a	Nf	ATATGTTTGACA	AACACATGCGGAAAACAGGGATATAAAATTTACAAGATAA		20	-	Temprana, 16.7-16.5
C1	$\phi 29$	TCAACGTTTACA	AAGTGAACAGGAAGTGT	TAAACTATATAGAGACAC	17	+	Temprana, 16.6-16.5
C2	Nf	AAATACTAGACA	ACCAGACTATAAAAATGT	TATACTATAGTTGTAGCA	17	+	Temprana, 17-16.5
	$\phi 29$	AAAGGGTAGACA	AACTATCGTTTAAACATGT	TATACTATAATAGAAGTA	18	+	

Los promotores se han alineado en relación a sus cajas -35 (excepto para el promotor A3) y -10 (excepto para el promotor A1IV). El motivo "TG" característico de los promotores denominados "promotores con caja -10 extendida" aparece subrayado dos veces. En las columnas de la derecha se indica: la distancia entre la caja -35 y la caja -10 (tamaño del espaciador); la presencia del motivo "TG" a una distancia de 1 pb *upstream* de la caja -10; y el momento de expresión del promotor a lo largo del ciclo infeccioso y los genes u ORF que se expresan desde el promotor.

El operón temprano del extremo derecho está bajo el control del promotor C2. En $\phi 29$ se ha demostrado que la unión de la proteína p6 a los extremos del genoma, por los cuales presenta gran afinidad, provoca la represión del promotor C2 a unos quince minutos de producirse la infección (Whiteley et al., 1986; Barthelemy et al., 1989; Monsalve et al., 1995; Camacho and Salas, 2001b). Probablemente, la proteína p6 de Nf esté actuando de forma similar sobre el promotor C2. El operón temprano situado en el extremo derecho del DNA de $\phi 29$ presenta un promotor adicional llamado C1 que transcribe las fases de lectura abierta 16.6 y 16.5. El genoma de Nf también presenta un posible promotor adicional en el operón temprano del extremo derecho denominado C1a, que transcribiría el gen 16.7 y las fases de lectura abierta 16.6 y 16.5.

En la secuencia del DNA de Nf existen equivalentes de los terminadores transcripcionales independientes de Rho, TD1 y TA1, presentes en el genoma de $\phi 29$, y se han denominado de la misma manera. La secuencia de estos terminadores se detalla en la Tabla 8. El terminador TA1 de ambos fagos está situado en el gen 4. Probablemente, parte de los transcritos producidos desde los promotores A2b y A2c finalicen en este terminador, lo que dará lugar a altos niveles de transcritos que codifican a las proteína p6 y p5 y niveles más bajos de transcritos de los genes localizados *downstream* del terminador. Esto está apoyado, en el caso de $\phi 29$, por el hecho de que las proteínas p5 y p6 son mucho más abundantes que las codificadas por los genes situados *downstream* del terminador (Mellado et al., 1980). El terminador TD1 de ambos fagos está situado en la región intergénica que separa el gen 16 y la fase de lectura abierta 16.5 del operón temprano situado en el extremo derecho. El terminador TD1 de $\phi 29$ es bidireccional (Barthelemy et al., 1987) y, probablemente, en Nf también, ya que contiene en ambas direcciones una cola rica en timinas.

Tabla 8. Terminadores transcripcionales

Nombre	Fago	Secuencia (5' – 3')	Posición
TA1	Nf	TTGAAAGAATCTGAATACGTGGTGTCTAACGGT [←] GATGCCACGTTTTTCTTTTCAAGTGAAA	3762-3702 T
	$\phi 29$	TTGAAGGAATCTGAATACGTGGCATCTAACACCGATGTCACGTTTTTCTTTTCAAGTGAAT	3859-3919 T
TD1	Nf	CGCCTGAAACAAAAACACCTGCTGT [→] TATAATAACGGCAGGCTTTTAAATAGTAATTCATTG	16990-16949
	$\phi 29$	AACAATCAAAAGAAAAGCCTATCGTCTGAGGAACGGTAGGCTTTTTGTAGCATATAGTTG	17258-17318

Las repeticiones invertidas se indican mediante flechas. Las secuencias finales de ambos terminadores, TD1 y TA1, en las cadenas temprana y tardía del DNA de $\phi 29$ se indican mediante una raya por encima o por debajo, respectivamente. A la derecha se indican las posiciones de las secuencias de DNA en el genoma del fago. T, cadena tardía.

2.3. Los genomas de $\phi 29$ y Nf presentan diferencias significativas en cuanto al número de secuencias consenso de unión al DNA de las proteínas Spo0A y Spo0J

Resulta muy interesante que el genoma de ambos fagos, $\phi 29$ y Nf, presenta diferencias importantes en cuanto al número de sitios de unión de Spo0A y Spo0J. Así, mientras $\phi 29$ presenta 6 cajas 0A (5'-TGTCGAA-3') y 5 sitios *parS* (5'-TGTTCCACGTGAAACA-3'), el genoma de Nf sólo contiene una caja 0A y dos sitios *parS* (ver Figura 31). La secuencia consenso de los sitios *parS* originalmente descrita (Lin and Grossman, 1998), ha sido redefinida recientemente (Breier and Grossman, 2007). Así, las 8 pb correspondientes a la mitad de la secuencia invertida imperfecta ha pasado a ser 5'-HGTTHCWY-3' siendo H=A, C o T, W=A o T, Y=C o T. Los dos sitios *parS* del genoma de Nf responden a esta nueva secuencia consenso. Estos sitios corresponden a los sitios *parS1* y *parS3* de $\phi 29$, por lo que se han denominado *parS1'* y *parS3'* (Figura 31). Mientras que los sitios *parS1* y *parS1'* presentan la misma secuencia, los sitios *parS3* y *parS3'* difieren en un nucleótido (ver Tabla 9).

Tabla 9. Alineamiento de los sitios *parS* de Nf y $\phi 29$

	Fago		Secuencia (5'-3') ^A		
parS-1	Nf	10042-	TGTTTCAC	GTGGAACA	-10057
	$\phi 29$	10445-	TGTTTCAC	GTGGAACA	-10460
parS-3	Nf	15529-	TGTTTCAC	GTGAAACA	-15544 ^B
	$\phi 29$	15906-	TGTTTCAC	GTGGAACA	-15921

^A: Las letras mayúsculas indican las posiciones que son iguales a las de la mitad de la secuencia consenso de un sitio *parS* del genoma de *B. subtilis* 5'-HGTTHCWY-3' (H=A, C, o T; W=A o T; Y=C o T).

^B: Las diferencias en la secuencia entre los dos fagos se indican en amarillo.

En cuanto a las cajas 0A, en el caso de $\phi 29$, una de las cajas, 0A-6, está situada muy cerca del extremo derecho del genoma, otra, 0A-5, muy cerca del promotor temprano C2 y las cajas 0A-1, 0A-2 y 0A-3, están localizadas en la región intergénica donde se localizan los promotores A2c, A2b y A3 (ver Figura 31). La única caja 0A del genoma de Nf se localiza en la región situada entre el promotor temprano A2b y el promotor tardío A3 (posiciones 4804-4810) y equivale a la caja 0A-3 del genoma de $\phi 29$ (posiciones 5131-5137). Por tanto, a esta caja 0A del genoma de Nf se le ha denominado 0A-3'.

Los ensayos de protección del DNA al corte con DNasa I revelaron que la unión de Spo0A a las cajas 0A del genoma de $\phi 29$ no se limita a los 7 pb que definen la secuencia consenso de unión de Spo0A. El análisis de las regiones protegidas puso de manifiesto que cada caja 0A presenta una semicaja 0A separada por 3 pb. Curiosamente, las regiones que flanquean

la caja 0A-3 de $\phi 29$ y Nf presentan bastantes diferencias, lo que sugiere una unión diferente de Spo0A a la caja 0A-3 y 0A-3'.

En conjunto, la comparación de las secuencias de DNA de los fagos $\phi 29$ y Nf revela que ambos fagos presentan una organización genética y transcripcional bastante similar. Sin embargo, presentan diferencias llamativas a nivel de posibles sitios de unión de las proteínas Spo0A y Spo0J lo que podría ser la causa de las diferencias observadas a nivel de lisis de cultivos infectados y a nivel de síntesis de DNA viral.

2.4. Análisis de los efectos de Spo0A sobre la transcripción del fago Nf

2.4.1. Al contrario que en $\phi 29$, Spo0A no reprime la transcripción *in vitro* del promotor temprano C2 de Nf y sólo parcialmente la del promotor temprano A2b

Las diferencias encontradas entre $\phi 29$ y Nf a nivel de: formación de placas de lisis, lisis de cultivos en medio líquido y cantidades de DNA viral producido, demuestran que el ciclo lítico y la replicación del fago Nf están reprimidos de manera dependiente de *spo0A* en menor extensión que en $\phi 29$. La secuenciación del genoma completo de Nf reveló que sólo contiene una caja 0A, equivalente a la caja 0A-3 en $\phi 29$. Aunque la secuencia consenso de unión al DNA de la proteína Spo0A es 5'-TGTCGAA-3', esta proteína puede unirse también a secuencias que presentan desviaciones respecto de la secuencia consenso. Además, se ha descrito que características estructurales del DNA pueden influir en la unión de Spo0A al DNA. Por tanto, la ausencia de cajas 0A en las proximidades de los promotores A2c y C2 de Nf no excluye la posibilidad de que puedan ser regulados por Spo0A. Por ello, se estudió si la proteína Spo0A reprime también la transcripción *in vitro* de los principales promotores tempranos de Nf y si interfiere con la activación, mediada por p4, del promotor tardío A3. Se realizaron experimentos de transcripción *in vitro* en presencia o ausencia de Spo0A. Los resultados muestran que Spo0A reprime la transcripción del promotor A2c (Figura 32A), pero no la transcripción del promotor C2 (Figura 32B). El promotor temprano A2b es levemente reprimido en presencia de las concentraciones más altas de Spo0A utilizadas (Figura 32C). Finalmente, la Figura 32D muestra que la activación, mediada por p4, del promotor tardío A3 es inhibida de manera dependiente de Spo0A.

En resumen, mientras que en $\phi 29$ Spo0A reprime la transcripción de los promotores A2c, A2b y C2 y previene la activación del promotor tardío A3, la transcripción del fago Nf sólo es regulada por Spo0A a nivel de la represión del promotor temprano A2c, de la prevención

de la activación, mediada por p4, del promotor tardío A3 y levemente a nivel de la represión del promotor A2b.

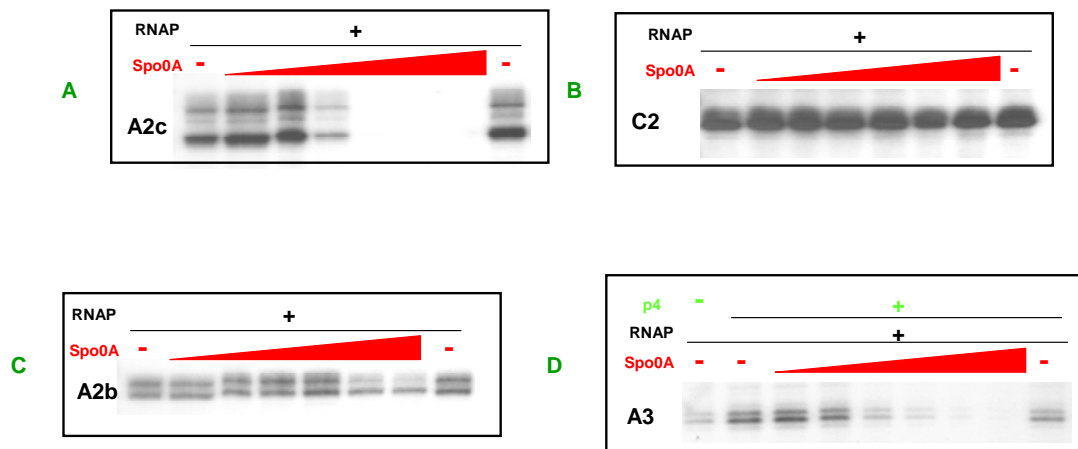


Figura 32. Ensayos de transcripción *in vitro* de los promotores A2c (A), C2 (B), A2b (C) y A3 (D) de Nf en presencia y ausencia de Spo0A. Se estudió la actividad de los promotores tempranos de Nf A2c, A2b y C2, y la del promotor tardío A3 en presencia de Spo0A, mediante ensayos de transcripción *in vitro*. Las mezclas de reacción contenían una concentración de 4 nM de cada uno de los moldes de DNA, 40 nM de RNAP y un rango de Spo0A comprendido entre 23 nM y 23,7 μM (diluciones seriadas en pasos de 4). En el caso del promotor A3, se añadieron 640 ng de p4.

2.4.2. Análisis de la unión de Spo0A a las regiones de los principales promotores de Nf

A continuación, se estudió la posible unión de Spo0A a las regiones de los principales promotores del genoma de Nf mediante ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I. En la Figura 33A se muestra el resultado del ensayo realizado con un fragmento del genoma de Nf que contiene la región del promotor temprano C2. Se observa que Spo0A no se une a esta región del genoma de Nf, lo que está de acuerdo con el resultado de transcripción *in vitro* en el que no se observa represión del promotor por Spo0A, además de que no hay (semi)cajas 0A en esta región del genoma. Sin embargo, la Figura 33B muestra que en presencia de Spo0A aparece una huella muy clara en las proximidades del promotor temprano A2c. En la Figura 34B se puede observar que la unión de Spo0A en las proximidades del promotor A2c protege una región de aproximadamente 35 pb en ambas cadenas. El análisis de la región protegida reveló que contiene dos semicajas 0A separadas por 3 pb (Figura 34). Cada semicaja presenta un nucleótido desviado respecto de la secuencia consenso. Además, la posición de estas semicajas es idéntica a la de la caja y semicaja 0A-1 del genoma de ϕ 29 por lo que se le ha denominado 0A-1'. Además, en la Figura 33 no se observa unión de Spo0A *upstream* del

promotor A2c lo que demuestra que no existe una caja equivalente a la caja 0A-2 de $\phi 29$ en el genoma de Nf.

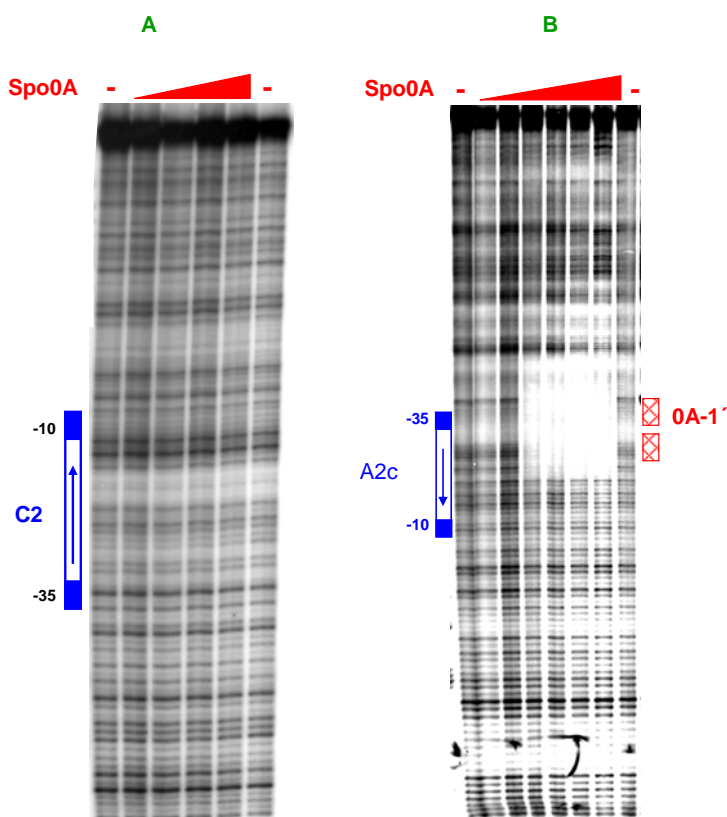


Figura 33. Spo0A no se une a la región del promotor temprano C2 (A) pero sí se une a la región del promotor temprano A2c (B) de Nf. Se marcaron los fragmentos radiactivamente en el extremo 5' de la cadena no codificante (A) y de la cadena codificante (B). Los rectángulos rojos a cuadros indican las posiciones de las semicajas 0A-1'. Los rectángulos azules indican las posiciones de las cajas -10 y -35 de ambos promotores. Se utilizó un rango de Spo0A comprendido entre 29 nM y 29,7 μ M (diluciones seriadas en pasos de 4). Los fragmentos de DNA utilizados en A y B se amplificaron mediante PCR usando como molde el DNA de NF y los oligonucleótidos Nf_RU_XbaI-Nf_150UpOriR y WF_2-WF_5, respectivamente.

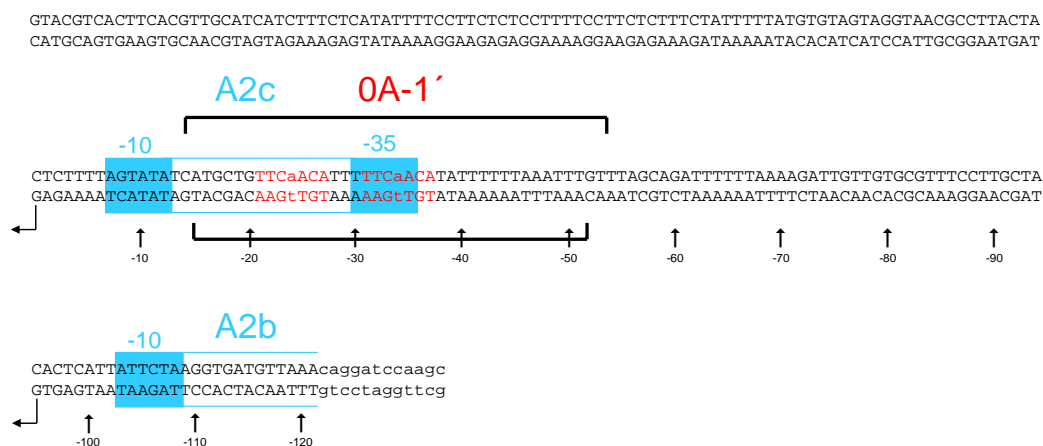


Figura 34. Esquema de las regiones protegidas por Spo0A en la región del promotor temprano A2c de Nf. Las barras negras situadas encima y debajo de la secuencia de DNA indican las regiones protegidas por Spo0A en ambas cadenas. La secuencia consenso de unión de Spo0A está indicada con letras rojas donde las desviaciones de la secuencia consenso de unión aparecen en minúsculas. Los sitios de iniciación de la transcripción están indicados mediante flechas curvadas negras. Las cajas -10 y -35 están recuadradas en azul. Las posiciones indicadas por debajo de las secuencias de DNA corresponden a posiciones desde el inicio de la transcripción del promotor A2c. Las letras mayúsculas y minúsculas corresponden a DNA de Nf y a secuencias plásmidicas, respectivamente.

2.4.3. La unión de Spo0A a 0A-1' impide la unión de la RNAP al promotor A2c

Como se muestra en las Figuras 32 y 33, Spo0A reprime la transcripción *in vitro* del promotor A2c de Nf y se une a la región del promotor. La unión de Spo0A podría estar interfiriendo con la unión de la RNAP al promotor A2c. Para estudiar esta posibilidad, se llevaron a cabo ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I en presencia de RNAP y en ausencia o presencia de cantidades crecientes de Spo0A. Como se observa en la Figura 35 (carriles del 3 al 8), la unión de Spo0A en las proximidades del promotor temprano A2c interfiere con la unión de la RNAP al promotor ya que a medida que va aumentando la cantidad de Spo0A en la reacciones, va desapareciendo la huella característica de la unión de la RNAP al promotor A2c de Nf.

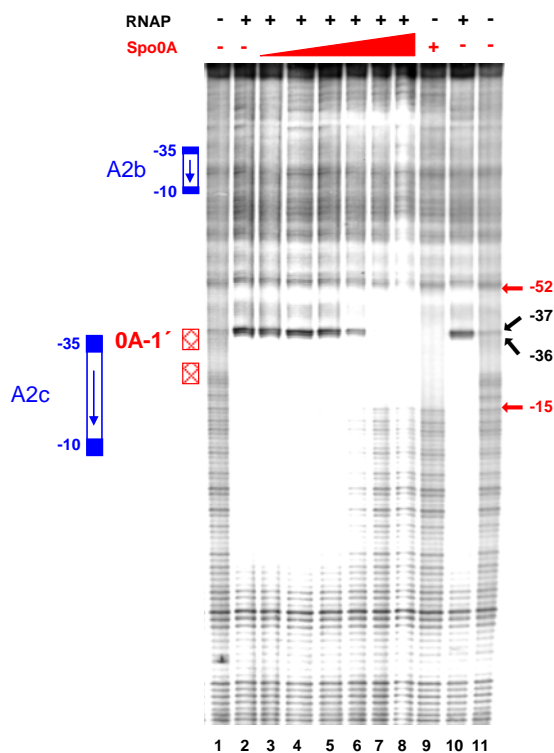


Figura 35. Análisis, mediante ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I, de la unión de RNAP al promotor A2c en presencia de Spo0A. Se marcó el fragmento de DNA en el extremo 5' de la cadena codificante y se incubó con cantidades crecientes de Spo0A y una concentración de 70 nM de RNAP. La numeración a la derecha de la imagen corresponde a las posiciones en la secuencia del DNA con respecto al inicio de la transcripción desde el promotor temprano A2c. Las cajas -10 y -35 y la dirección de la transcripción de los promotores A2b y A2c se indican mediante rectángulos azules y flechas azules, respectivamente. Los rectángulos rojos a cuadros indican las semicajas 0A de la región del promotor A2c de Nf. Las flechas negras indican las hipersensibilidades generadas por la unión de la RNAP. Las flechas rojas delimitan la región protegida tras la unión de Spo0A. Se utilizó un rango de concentración de Spo0A de 29 nM a 29,7 μM (diluciones seriadas en pasos de 4). En el carril 9 se usó una concentración de Spo0A de 7,4 μM. El fragmento de DNA utilizado es el mismo que el utilizado para el ensayo presentado en el apartado **B** de la Figura 33.

2.4.4. Spo0A se une a la caja 0A-3' e impide el reclutamiento, mediado por p4, de la RNAP al promotor tardío A3, pero no interfiere con la unión de la RNAP al promotor temprano A2b

La única caja 0A consenso presente en el genoma de Nf, denominada caja 0A-3', está localizada en la región intergénica que separa el promotor temprano A2b y el promotor tardío A3. La Figura 36 muestra que Spo0A se une a la región del genoma de Nf que incluye la caja 0A-3'. En $\phi 29$, la unión de Spo0A a la caja equivalente 0A-3' previene la activación del promotor tardío A3 de Nf. Los resultados de la Figura 32 mostraron que Spo0A previene la activación mediada por p4 del promotor A3. Por tanto, se llevaron a cabo ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I para estudiar el mecanismo inhibitorio. Al igual que ocurre en $\phi 29$, el promotor tardío A3 de Nf carece de caja -35 por lo que necesita la unión de p4 al sitio 3 para reclutar a la RNAP al promotor. En la Figura 36A se presenta el resultado del ensayo de protección del DNA a la digestión con DNasa I de un fragmento de DNA de Nf que contiene la secuencia del promotor A3 en presencia de RNAP, p4 y en ausencia o presencia de Spo0A. En el carril 15 se observa la unión cooperativa de la RNAP y p4 al promotor. Sin embargo, en presencia de Spo0A (carriles del 16 al 21), se pierde esta unión cooperativa observándose sólo las características de la unión de la proteína p4 y de la proteína Spo0A. Por tanto, la unión de Spo0A a la caja 0A-3' previene la activación, mediada por p4, del promotor tardío A3, y p4 y Spo0A se unen de forma simultánea en la región del promotor A3.

En $\phi 29$, la unión de Spo0A a la caja 0A-3' previene la unión de la RNAP al promotor temprano A2b. Por tanto, estudiamos si ocurría lo mismo en Nf. Al igual que en $\phi 29$, la unión de la RNAP al promotor A2b de Nf no genera una huella clara, sino que la unión de la RNAP al promotor se caracteriza por la generación de una hipersensibilidad en la posición -37 con respecto al inicio de la transcripción del promotor A2b (Figura 36B, carril 4). Como se observa en la Figura 36B (carriles del 5 al 10), la presencia de Spo0A afecta únicamente y de una manera parcial, a la unión de la RNAP al promotor a las concentraciones más altas utilizadas. Este resultado está de acuerdo con los resultados de los ensayos de transcripción *in vitro*.

En conjunto, estos resultados demuestran que la unión de Spo0A a la región que comprende la caja 0A-3' previene el reclutamiento, mediado por p4, de la RNAP al promotor tardío A3, pero sólo interfiere ligeramente con la unión de la RNAP al promotor temprano A2b a las concentraciones más altas de Spo0A utilizadas.

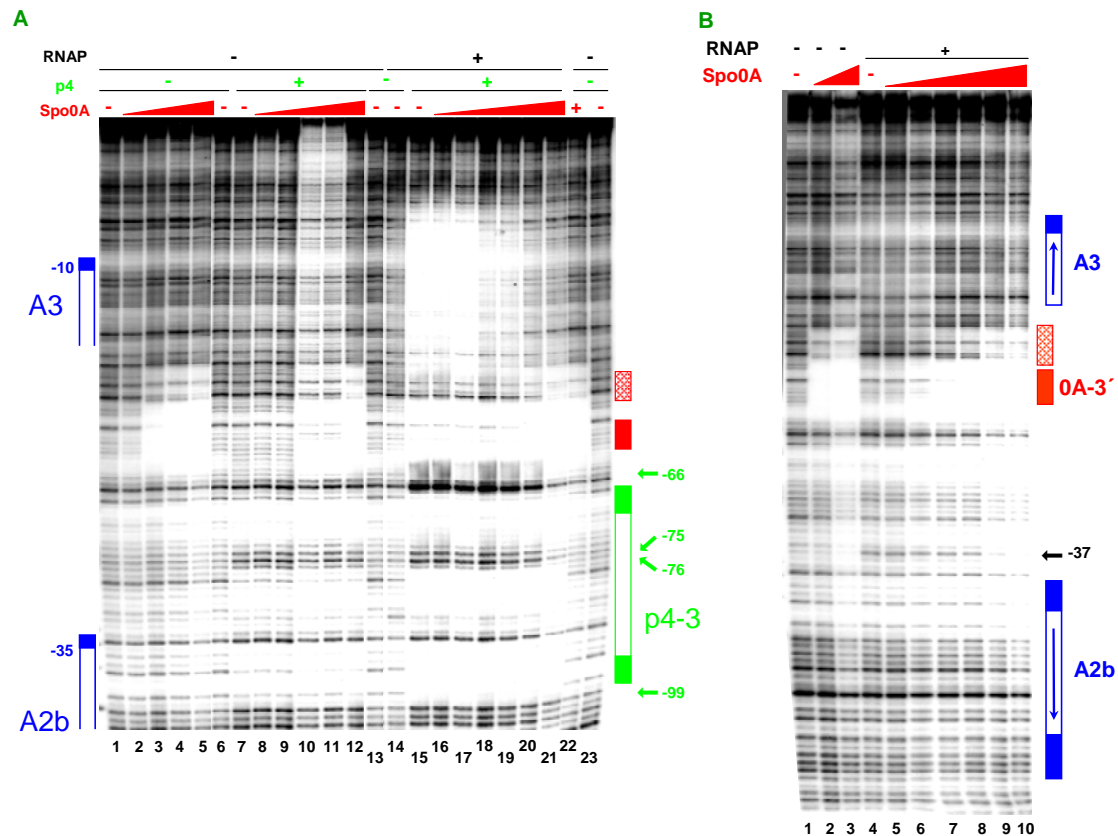


Figura 36. La unión de Spo0A a la región de la caja 0A-3' previene el reclutamiento, mediado por p4, de la RNAP al promotor tardío A3 (A) pero apenas interfiere con la unión de la RNAP al promotor temprano A2b de Nf (B). Los fragmentos de DNA utilizados incluyen el promotor A3, la caja 0A-3', el sitio 3 de unión de p4 y el promotor temprano A2b. A la derecha de las imágenes se indican las posiciones en el DNA con respecto al inicio de la transcripción desde el promotor A2b (B) y desde el promotor A3 (A). Los fragmentos se marcaron en el extremo 5' de la cadena temprana. Las hipersensibilidades generadas tras la unión de p4 se indican con flechas verdes. La flecha negra en el apartado B indica la posición que se vuelve hipersensible tras la unión de la RNAP al promotor A2b. El rectángulo verde indica el sitio 3 de unión de p4. Los rectángulos azules representan la caja -10 de los promotores A2b y A3 y la caja -35 del promotor A2b. Las concentraciones usadas de RNAP y p4 fueron de 70 nM y 2,3 μM, respectivamente. Se utilizó un rango de Spo0A comprendido entre 29 nM y 29,7 μM (diluciones seriadas en pasos de 4). En B (carriles 2 y 3), se utilizó una concentración de 7,4 y 29,7 μM de Spo0A, respectivamente. En A (carriles del 2 al 5), el rango de concentración de Spo0A fue de 116 nM a 29,7 μM (diluciones seriadas en pasos de 4). El fragmento de DNA utilizado como molde en los ensayos mostrados en ambos apartados se amplificaron mediante PCR usando como molde el DNA de NF y los oligonucleótidos Nf_A2bL2-Nf_+50A3Up.

En $\phi 29$, la unión de Spo0A a la caja 0A-3' previene el reclutamiento, mediado por p4, de la RNAP al promotor A3 e interfiere también con la unión de la RNAP al promotor A2b. Estas diferencias entre $\phi 29$ y Nf a nivel de la regulación de los promotores A2b y A3 por Spo0A, podrían ser debidas a una unión diferente de Spo0A a la caja conservada 0A-3. Para estudiar esta posibilidad se obtuvieron fragmentos de DNA de ambos fagos que comprendían exactamente el mismo número de pb *upstream* y *downstream* de las cajas 0A-3 y 0A-3'. Se marcaron radiactivamente en la misma cadena del DNA y se comparó el patrón de unión de

Spo0A mediante protección del DNA a la digestión con DNasa I. Como se ve en la Figura 37, mientras que la unión de Spo0A a la región de la caja 0A-3 se extiende hacia la región del promotor A2b, la situación en Nf es la contraria, es decir, la unión de Spo0A se extiende hacia la región del promotor tardío A3. El análisis de las secuencias protegidas reveló que, mientras que $\phi 29$ presenta una secuencia similar a la de las cajas 0A separada por 3 pb de 0A-3 y que aparece protegida en presencia de Spo0A, una secuencia similar a la caja 0A, separada también por 3 pb de 0A-3' se localiza en posición inversa en el genoma de Nf. Esta diferente localización de las semicajas explicaría la leve represión del promotor A2b en presencia de Spo0A en Nf y la prevención de la activación, mediada por p4, del promotor A3.

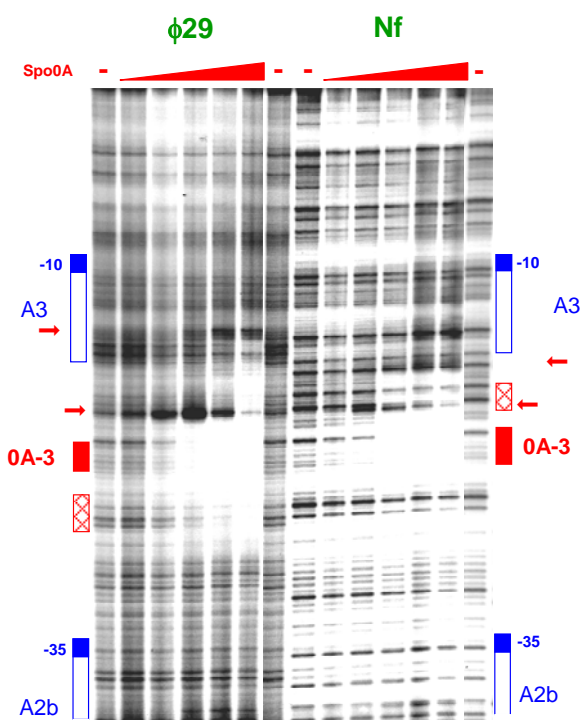


Figura 37. Análisis comparativo de la unión de Spo0A a la región de las cajas 0A-3 y 0A-3' localizadas en las proximidades del promotor A3 del DNA de $\phi 29$ y Nf, respectivamente. Los fragmentos de DNA utilizados incluyen el promotor A3, la caja 0A-3/0A-3', el sitio 3 de unión de p4 y el promotor temprano A2b de cada uno de los fagos. Los fragmentos están marcados en el extremo 5' de la cadena temprana a la misma distancia de las cajas 0A-3 y 0A-3', respectivamente. Las flechas rojas indican las hipersensibilidades generadas tras la unión de Spo0A. La posición de las cajas 0A-3 y 0A-3' están representadas mediante rectángulos rojos y las semicajas que las flanquean mediante rectángulos rojos a cuadros. Los rectángulos azules indican las cajas -10 de los promotores A2b y A3. Se utilizó un rango de Spo0A comprendido entre 29 nM y 29,7 μ M (diluciones seriadas en pasos de 4). El fragmento de DNA de $\phi 29$ utilizado como molde se obtuvo mediante PCR usando los oligonucleótidos A2bL2-seq5 y utilizando como molde el plásmido pDM_A3. El fragmento de DNA de Nf se obtuvo mediante amplificación por PCR usando los oligonucleótidos Nf_A2bL2-Nf_+50A3Up utilizando como molde el DNA de Nf.

2.5. Efecto de Spo0A sobre la replicación del bacteriófago Nf

2.5.1. Spo0A se une a los extremos del genoma de Nf pero no interfiere con la unión de la proteína p6

Resultados expuestos anteriormente muestran que Spo0A se une a secuencias específicas de los extremos del genoma de $\phi 29$ interfiriendo con la iniciación de la replicación al prevenir la formación del complejo p6-DNA. Se llevaron a cabo experimentos para estudiar si Spo0A también se une a los extremos del genoma de Nf y si interfiere con la formación del complejo iniciador de la replicación p6-DNA. La Figura 38 muestra los ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I en presencia de Spo0A, utilizando como molde fragmentos de DNA de cada uno de los extremos del genoma de Nf. Spo0A es capaz de unirse a ambos extremos aunque las regiones protegidas tras su unión son más pequeñas y están localizadas más hacia los extremos que en $\phi 29$ (comparar Figura 38A y B, carriles del 7 al 10, y Figura 23A y B, carriles del 2 al 6). El análisis de las regiones protegidas por Spo0A reveló que los extremos del genoma de Nf presentan dos sitios de unión de Spo0A, con variaciones a nivel de uno o dos nucleótidos respecto de la secuencia consenso (ver Discusión).

La proteína p6 se une a los extremos del genoma de Nf generando un patrón de regiones protegidas y bandas hipersensibles muy característico (carriles del 2 al 5 de los apartados A y B de la Figura 37, Freire et al., 1996). Se realizaron ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I para estudiar si, al igual que ocurre en los extremos del genoma de $\phi 29$, la unión de Spo0A interfiere con la unión de p6. Los resultados presentados en la Figura 38 muestran que sólo a la concentración más alta de Spo0A utilizada se observa una pérdida parcial de la unión de la proteína p6 en ambos extremos del genoma de Nf. Aunque en estas condiciones las hipersensibilidades generadas tras la unión de p6 son menos claras que en presencia de cantidades más bajas de Spo0A, no se observa una pérdida total de las mismas.

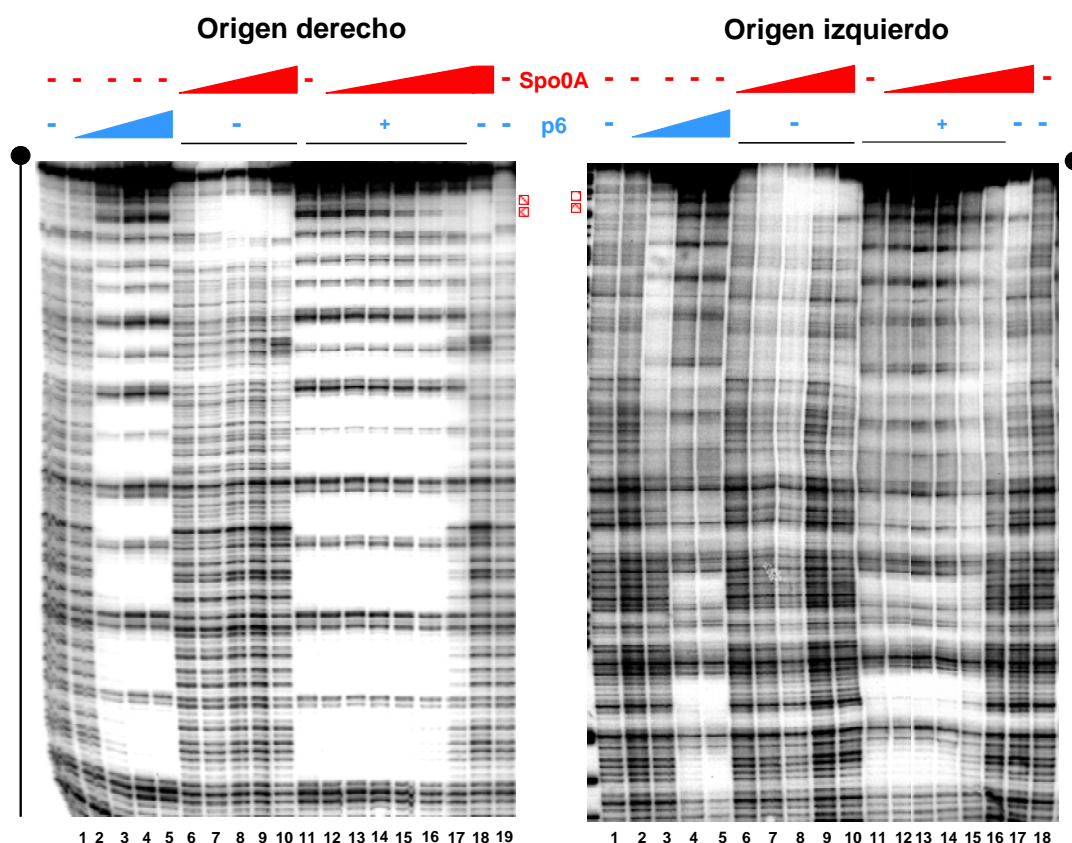


Figura 38. Spo0A se une a los extremos del genoma de Nf pero no interfiere con la unión de la proteína p6. Análisis, mediante ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I, de la unión de Spo0A a los extremos izquierdo y derecho del genoma de Nf en ausencia (carriles 6 a 10) o en presencia (carriles del 12 al 17 para el extremo derecho y del 12 al 16 para el extremo izquierdo) de p6. Los fragmentos utilizados se marcaron radiactivamente en el extremo 5' y se incubaron con las proteínas. En los carriles indicados, se añadieron 4 µg de p6 de Nf 10 min después de haber añadido Spo0A. La concentración de Spo0A utilizada fue de 116 nM a 29,7 µM (diluciones seriadas en pasos de 4). El carril 18 de **A** y el carril 17 de **B** contienen una concentración de Spo0A de 29,7 µM. En los carriles del 2 al 5 se observa el patrón generado por la unión de la proteína p6. La parte de arriba de cada panel corresponde al final de la secuencia del genoma de Nf. Los fragmentos de DNA del origen derecho y del origen izquierdo se obtuvieron mediante amplificación por PCR usando como molde el DNA de Nf y los oligonucleótidos Nf_Right_L-Nf_Up_200OriR y Nf_Left_Up-Nf_LL2, respectivamente.

2.5.2. Spo0A no interfiere con la iniciación de la replicación del genoma de Nf *in vitro*

Para estudiar si Spo0A interfiere con la iniciación de la replicación de Nf se llevaron a cabo ensayos de iniciación de la replicación del genoma de Nf *in vitro* en ausencia o presencia de cantidades crecientes de Spo0A. Como se muestra en la Figura 39, el rango de concentración de Spo0A utilizado no afecta a la iniciación *in vitro* de la replicación del DNA de Nf mediada por p6.

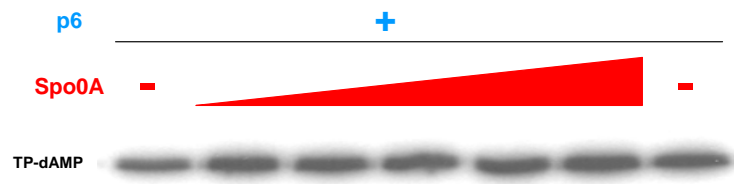


Figura 39. Spo0A no inhibe la iniciación *in vitro* de la replicación del DNA de Nf mediada por p6. Se midió la iniciación de la replicación en presencia de cantidades crecientes de Spo0A. Las mezclas de reacción contenían DNAP (10 ng), TP (10 ng), TP-DNA de Nf (500 ng), p6 (10 μ g), 0,1 μ M de [α - 32 P]dATP (1 μ Ci) y ausencia o presencia de cantidades crecientes de Spo0A. Después de incubar las reacciones 10 min a 30°C, se pararon, se procesaron y se analizaron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes. Se indica en la figura la posición en la que migra el producto de la iniciación, TP-dAMP. El rango de concentración de Spo0A utilizado fue de 1,2 μ M a 37 μ M (diluciones seriadas en pasos de 2).

3. Papel de SpoOA en el inicio de la replicación del cromosoma de *B. subtilis*

3.1. La proteína Spo0A se une a varias secuencias localizadas en la región del *oriC* de *B. subtilis*

La Figura 40 muestra un esquema representativo de la región del *oriC* de *B. subtilis*. La región de *incB* presenta una caja 0A, representada con un triángulo rojo. Mediante ensayos de retraso en gel, Molle et al. (2003) demostraron que el dominio C-terminal de unión al DNA de Spo0A se une a la región del *oriC* de *B. subtilis*. La secuencia consenso de unión al DNA de Spo0A, 5'-TGTCGAA-3', comparte cierta homología con la secuencia complementaria a la que define el sitio consenso de unión de la proteína iniciadora de la replicación de *B. subtilis*, DnaA, 5'-TGTGGATAA-3'. Dado que Spo0A es capaz de unirse a secuencias de DNA similares a las de su secuencia consenso de unión, podría ser posible que se uniera a las cajas de DnaA presentes en la región del *oriC*. Si esto fuera así, Spo0A podría interferir con el inicio de la replicación del DNA de *B. subtilis*.

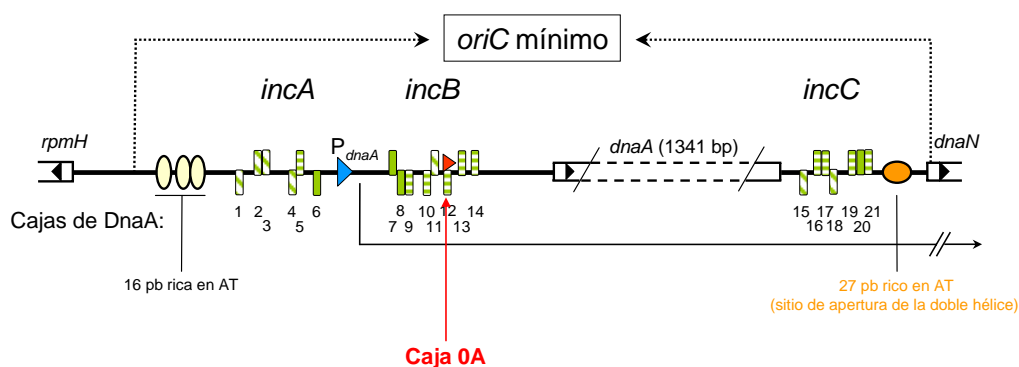


Figura 40. Esquema representativo de la región del *oriC* de *B. subtilis*. Los rectángulos verdes representan las cajas y semicajas de DnaA que están numeradas del 1 al 21. Las rellenas representan las cajas cuya secuencia es exacta a la consenso, las que tienen rayas diagonales contienen una desviación respecto de la consenso y las que tienen rayas horizontales presentan dos desviaciones respecto de la secuencia consenso. Las cajas y semicajas de DnaA están situadas por encima o por debajo de la línea que representa el DNA en función de si están en una cadena o en la otra. Las regiones en que se agrupan las cajas y semicajas de DnaA *upstream* (*incA* e *incB*) y *downstream* (*incC*) del gen de *dnaA* están indicadas. El triángulo rojo representa la caja 0A. El óvalo naranja representa la región de 27 pb rica en bases AT donde se produce la apertura inicial de la doble hélice. Los óvalos amarillos representan las repeticiones de 16 pb ricas en bases AT. La dirección de la transcripción de los genes situados en esta región está indicada mediante cabezas de flechas. Las flechas curvas intermitentes delimitan la región mínima del *oriC*.

Como primera aproximación para profundizar en este estudio, se analizó la posible unión de Spo0A a la región del *oriC* mediante ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I. Para ello se utilizaron fragmentos de DNA correspondientes a las regiones de *incA*, *incB* e *incC* y se incubaron con Spo0A. Los ensayos realizados con el fragmento que contiene la región de *incC* demostraron que Spo0A no se une a esta región del *oriC* de *B.*

subtilis (resultados no mostrados). Sin embargo, en las Figura 41A y B se pueden apreciar las huellas dejadas por Spo0A al unirse a las regiones de *incA* e *incB*, respectivamente. En el caso de *incB*, la unión de Spo0A protege una región de aproximadamente 30 pb que incluye la secuencia de la caja 0A. A medida que se va aumentando la cantidad de Spo0A, esta región protegida se va extendiendo en dirección 5' (Figura 41B, carriles del 2 al 6). Un análisis de la secuencia de la región protegida reveló que contiene, además de la caja 0A, 3 semicajas 0A adicionales. La direccionalidad de las cuatro secuencias es la misma y están separadas unas de otras por 3 pb. Por tanto, la organización de las cajas y semicajas 0A de *incB* es muy similar a la que presentan los extremos del genoma de $\phi 29$ (Figura 42). En la Figura 41 se ve como la caja 0A y dos de las semicajas coinciden con cajas de DnaA (Fukuoka et al., 1990). Lo que resulta muy interesante es que la secuencia consenso de unión de Spo0A, 5'-TGTCGAA-3', que se localiza en la región de *incB*, corresponde a una semicaja de DnaA con dos nucleótidos, indicados con letras minúsculas, 5'-TTtTCgACA-3', que se desvían de la secuencia consenso, 5'-TTATCCACA-3'. O lo que es lo mismo, una semicaja de DnaA con dos desviaciones respecto de la secuencia consenso, genera una secuencia consenso de unión de Spo0A. Una situación similar tiene lugar para las otras semicajas de DnaA que aparecen protegidas en presencia de Spo0A. Así, la desviación en un nucleótido respecto de la secuencia consenso en la semicaja DnaA 11, cuya secuencia es 5'-TTgTCCACA-3', donde la letra minúscula indica el nucleótido desviado, y las dos desviaciones respecto de la secuencia consenso en la semicaja DnaA 10, 5'-TTcTaCACA-3', generan dos semicajas 0A con uno y dos nucleótidos desviados de la secuencia consenso, respectivamente. En resumen, la unión de Spo0A a esta región solapa con 3 sitios funcionales de unión de DnaA.

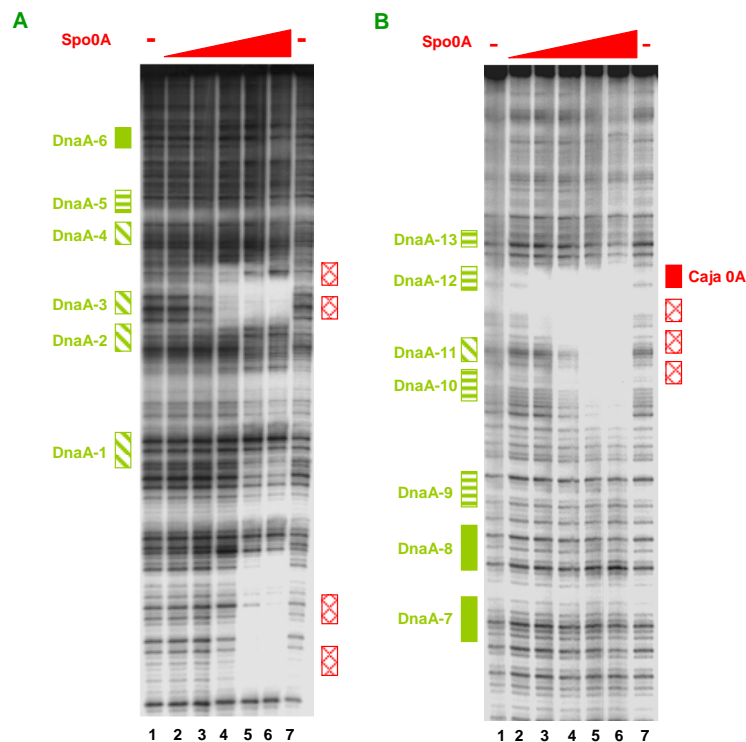


Figura 41. Spo0A se une a la región de *incA* e *incB* del *oriC* de *B. subtilis*. Análisis, mediante ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I, de la unión de Spo0A a la región de *incA* (A) e *incB* (B). Fragmentos de DNA de la región del *oriC* correspondientes a las posiciones de la 314 a la 626 (A) y de la 86 a la 387 (Moriya et al., 1992) (B) se marcaron en el extremo 5' y se incubaron en ausencia o presencia de cantidades crecientes de Spo0A. Los rectángulos rojos rellenos y a cuadros representan las cajas y semicajas 0A, respectivamente. Los rectángulos verdes representan las cajas y semicajas de DnaA. La numeración y relleno de las mismas corresponde a lo indicado en la Figura 40. El rango de concentración de Spo0A utilizado fue de 116 nM a 29,7 μ M (diluciones seriadas en pasos de 4). Los fragmentos de DNA utilizados en los apartados A y B se amplificaron mediante PCR con los oligonucleótidos AaUp_U-Aa_Up_L2 y Aa_UP_U2-Aa_UP_L, respectivamente.

En cuanto a la región de *incA* (Figura 41A), la unión de Spo0A protege dos regiones distintas. La región situada *downstream*, contiene dos semicajas 0A, una con 1 pb desviado respecto a la secuencia consenso y la otra con dos desviaciones, y están separadas por 4 pb. También en este caso, estas semicajas 0A solapan con semicajas de DnaA (Figura 42). La segunda región que aparece protegida por Spo0A en la región de *incA*, corresponde a una región de 45 pb que separa las 3 repeticiones de una secuencia de 16 nucleótidos rica en bases AT de la agrupación de cajas y semicajas de DnaA de *incA*. Mientras que la zona más *upstream* de esta región aparece completamente protegida en presencia de Spo0A, la región más *downstream* sólo aparece protegida, y de una manera parcial, cuando se incubaba con las concentraciones de Spo0A más altas utilizadas. El análisis de la región completamente protegida puso de manifiesto que

posee dos semicajas 0A con 3 desviaciones respecto de la secuencia consenso, separadas por 3 pb.

En conjunto estos resultados demuestran que Spo0A se une a las regiones de *incB* e *incA* del *oriC* de *B. subtilis*, solapando con sitios funcionales de unión de la proteína DnaA, exceptuando la región de 45 pb cercana a la región rica en bases AT de *incA*.

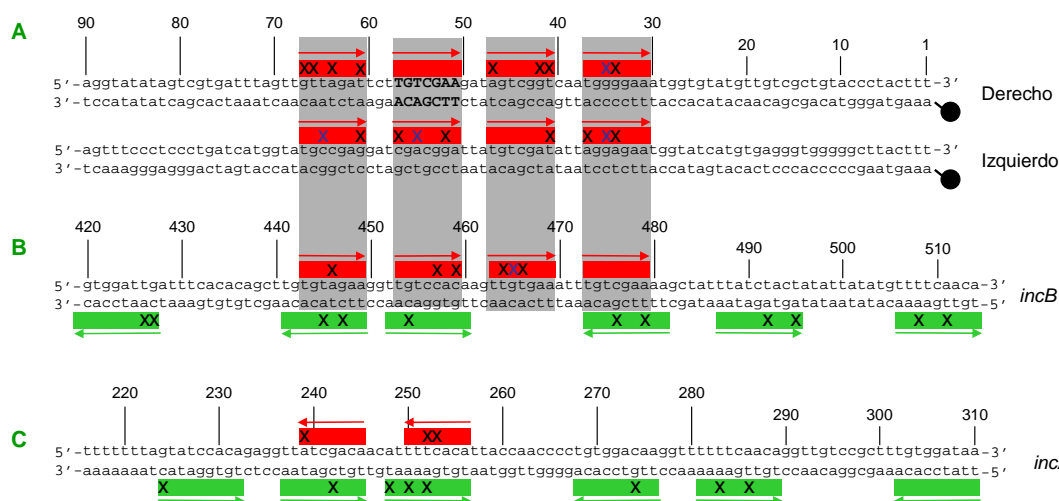


Figura 42. Organización de las cajas y semicajas 0A en los orígenes de replicación de $\phi 29$ y en el *oriC* de *B. subtilis*. Las posiciones de las (semi)cajas 0A y de las (semi)cajas de DnaA están indicadas mediante rectángulos rojos y verdes, respectivamente. Las cruces en el interior de los rectángulos indican las posiciones que se desvían de la secuencia consenso de unión de Spo0A o de DnaA. (A) Secuencias del extremo derecho y del extremo izquierdo del DNA de $\phi 29$. Los círculos negros representan a la TP unida de forma covalente en los extremos 5'. (B) Secuencia de la región de *incB* del *oriC* de *B. subtilis* que contiene la caja 0A. Es importante resaltar que la organización de las (semi)cajas 0A de esta región del *oriC* es muy similar a la de los extremos de $\phi 29$. Además, la caja 0A y varias semicajas 0A solapan con (semi)cajas de DnaA. (C) Secuencia de la región de *incA* del *oriC* de *B. subtilis* que presenta dos semicajas 0A que solapan con dos semicajas de DnaA. La numeración en B y C corresponde a la descrita por Moriya et al. (1992).

3.2. Spo0A previene la apertura de la doble hélice del DNA mediada por la proteína DnaA necesaria para la iniciación de la replicación del DNA de *B. subtilis*

La iniciación de la replicación del cromosoma de *B. subtilis* requiere la unión de la proteína DnaA a sus 21 sitios de unión presentes en la región del *oriC* (ver figura 40, Moriya et al., 1990). Un paso crucial en el inicio de la replicación es la apertura de la doble hélice del DNA, mediada por DnaA. Krause et al. (1997) demostraron que el sitio inicial de apertura de la doble hélice es una secuencia rica en bases AT de 27 nucleótidos cercana a la región de *incC*.

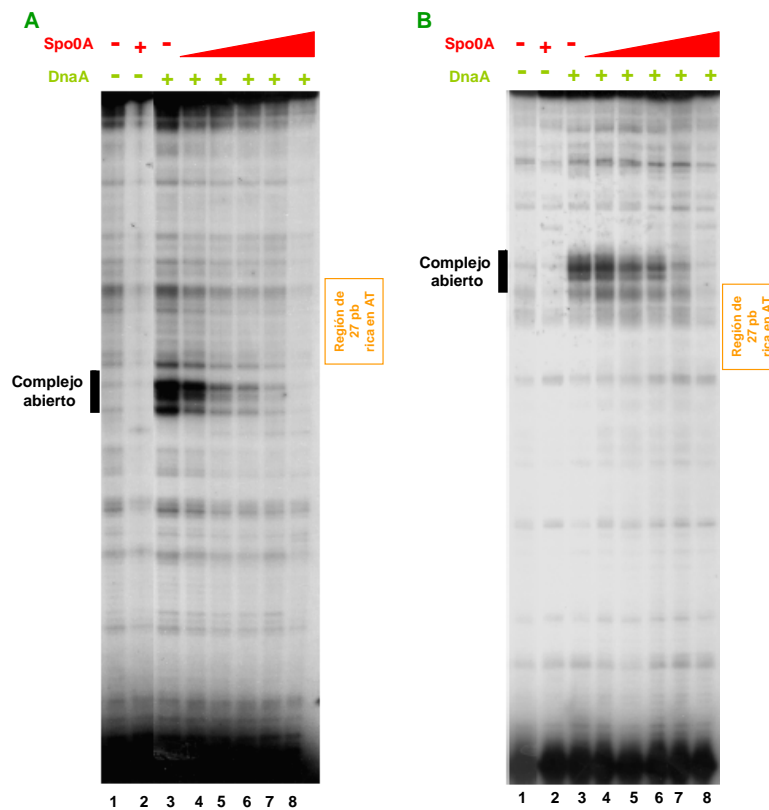


Figura 43. Spo0A inhibe la formación, mediada por DnaA, del complejo abierto de iniciación de la replicación en el *oriC* de *B. subtilis*. Mediante un ensayo de sensibilidad al tratamiento con KMnO_4 se analizó la formación, mediada por DnaA, del complejo abierto de iniciación de replicación utilizando como molde el plásmido superenrollado pBsOric4 y en presencia de 100 ng de HBSu. Están indicadas las posiciones que se vuelven hipersensibles tras el tratamiento con KMnO_4 en ambas cadenas del DNA y las regiones de 27 pb ricas en bases AT. En los carriles indicados se añadió una cantidad fija de DnaA (262 nM) y un rango de concentración de Spo0A que fue de 0,48 μM a 7,9 μM . La cuantificación de tres experimentos demostró que la formación del complejo abierto está inhibida en un 70% a una concentración de Spo0A de 1,98 μM .

Para estudiar si la unión de Spo0A a la región del *oriC* interfiere con la apertura *in vitro* de la doble hélice de DNA, y, por tanto, si interfiere con el inicio de la replicación del DNA de *B. subtilis*, se siguió la estrategia desarrollada por Krause et al. (1997). El ensayo es una variación del ensayo de sensibilidad al tratamiento con KMnO_4 en el que el molde es un DNA circular, en lugar de un fragmento de DNA lineal. El molde utilizado es un plásmido en el que se ha clonado la región del *oriC* de *B. subtilis*. Una vez tratado el molde con KMnO_4 , que provoca cortes en la doble cadena de DNA cuando se encuentra timinas desapareadas, se lleva a cabo un ensayo de extensión de un cebador. Como se esperaba, en ausencia de Spo0A, se observa la formación del complejo abierto de replicación, mediado por DnaA, en las mismas posiciones que las descritas por Krause et al. (1997) (ver Figura 43A y B, carril 3). Sin embargo, la formación del complejo abierto de replicación va siendo inhibida de una manera

dependiente de la dosis de Spo0A (Figura 43). Estos resultados demuestran que Spo0A bloquea la iniciación de la replicación del genoma de *B. subtilis* impidiendo la formación del complejo abierto de replicación mediado por DnaA.

3.3. Spo0A reprime la transcripción del promotor de *dnaA* localizado en el origen de replicación de *B. subtilis*

La región de *incB* está localizada en la región del *oriC* que separa el promotor de *dnaA* de la secuencia del propio gen. De hecho, la caja 0A localizada en la región de *incB*, flanqueada por las 3 semicajas, está a una distancia de 114 pb *downstream* del promotor. Por tanto, la unión de Spo0A a la región de *incB* podría estar interfiriendo con la transcripción del gen *dnaA*. Como primera aproximación, se realizaron ensayos de transcripción *in vitro* utilizando como molde un fragmento de DNA lineal que incluía el promotor de *dnaA* y 268 pb *downstream*. Sorprendentemente, no se observaba la producción de transcritos utilizando como molde este fragmento de DNA lineal. Se sabe que algunos promotores necesitan encontrarse en forma super enrollada para ser capaces de iniciar la transcripción (Whitehall et al., 1992; Rojo et al., 1993; Sun and Fuchs, 1994). Por lo que se realizaron de nuevo los ensayos de transcripción *in vitro* utilizando como molde el plásmido pBsOric4, que contiene el *oriC* de *B. subtilis*. Después de realizar el ensayo de transcripción *in vitro*, se precipitaron los posibles transcritos y se determinaron los niveles de transcripción mediante la extensión de un cebador marcado radiactivamente en el extremo 5'. En la Figura 44 se muestra el resultado de los ensayos. Se observa que la transcripción del gen *dnaA* es inhibida de una manera dependiente de la cantidad de Spo0A.

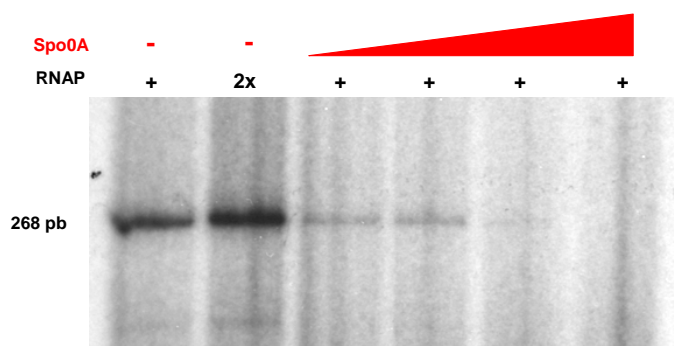


Figura 44. Spo0A reprime la transcripción del gen *dnaA* situado en la región del *oriC* de *B. subtilis*. Se analizó la transcripción del gen *dnaA* en ausencia o presencia de Spo0A mediante ensayos de transcripción *in vitro* acoplado a la extensión de un cebador, utilizando como molde el plásmido pBsOric4 superenrollado. En la figura se indica el tamaño del transcrito. El rango de Spo0A utilizado fue de 2 μ M a 16 μ M (diluciones seriadas en pasos de 2).

Discusión

Algunas bacterias, entre ellas *B. subtilis*, son capaces de sobrevivir a condiciones ambientales desfavorables mediante la producción de esporas. La spora es una de las estructuras biológicas más resistentes de la naturaleza (Nicholson et al., 2000). La bacteria inserta una copia de su material genético en la pre-espora protegiéndolo así de casi cualquier ataque externo. Una vez que las condiciones ambientales vuelven a ser favorables para el desarrollo de la bacteria, la spora germina y la bacteria retoma su desarrollo. Ya desde los años 70 se sabía que, cuando algunos fagos infectan células de *B. subtilis* que se encuentran en los primeros estadios de la esporulación, son capaces de suprimir su ciclo lítico e incorporar su genoma en el interior de las esporas. Esto le permite al fago posponer el desarrollo de su ciclo lítico hasta que las condiciones ambientales sean las más favorables para la producción de progenie (revisado recientemente en, Sonenshein, 2006). Sin embargo, hasta ahora, nada se sabía sobre los mecanismos moleculares que regulan el desarrollo de esta estrategia de infección alternativa. Uno de los fagos que desarrolla dicha estrategia es el bacteriófago $\phi 29$. Este fago ha sido utilizado desde hace muchos años como sistema modelo en Biología Molecular lo que ha permitido que en la actualidad se conozcan, con bastante detalle, los mecanismos que llevan a cabo la transcripción y la replicación de su material genético. Este amplio conocimiento sobre el bacteriófago le convertía en un buen candidato para el estudio de las bases moleculares de la estrategia de infección alternativa, lo cual ha sido el objetivo fundamental de esta tesis. Esta estrategia necesita, por un lado, la supresión del desarrollo del ciclo lítico del fago, y, por otro, un mecanismo que incorpore el genoma del fago en la pre-espora.

Los resultados presentados en esta tesis han demostrado que no son proteínas virales, sino proteínas de la célula huésped, las responsables de llevar a cabo el proceso. Por un lado, la proteína Spo0J, que está implicada en la segregación del cromosoma bacteriano, y por otro, la proteína Spo0A, que es la proteína esencial de entrada en esporulación.

Moreno (1979) mostró que la presencia de una sola molécula de DNA de $\phi 29$ en la célula infectada es suficiente para que se produzca la incorporación de la misma en la pre-espora. Además, mostró que no se necesita síntesis de DNA viral para que tenga lugar la incorporación. Estos dos resultados sugerían que la incorporación del genoma del fago en el interior de la pre-espora tenía lugar a través de un proceso de segregación activo. La proteína Spo0J de *B. subtilis* está involucrada en la segregación del cromosoma, tanto durante el crecimiento vegetativo como durante la esporulación, mediante la unión a secuencias denominadas sitios *parS* localizadas en las proximidades del *oriC* (revisado en, Sullivan and Maddock, 2000). Resultados presentados en esta tesis muestran que los sitios *parS* del genoma de $\phi 29$ juegan un papel en la incorporación del genoma del fago en la pre-espora a través de la unión de la proteína Spo0J a los mismos. Por un lado, los experimentos de entrecruzamiento *in vivo* e inmunoprecipitación demostraron que la proteína Spo0J se une *in vivo* a las regiones del

genoma de $\phi 29$ que contienen secuencias *parS*. Por otro, se ha observado que la eficiencia de incorporación del genoma del fago en la pre-espora es más baja en una estirpe delecionada en el operón *soj-spo0J*, en comparación con la eficiencia de incorporación que presenta la estirpe wt. Además, la presencia de un sitio *parS* de $\phi 29$ en una variante de un plásmido de bajo número de copias e inestable desde el punto de vista de la segregación, aumenta la eficiencia de incorporación del plásmido en la pre-espora de una manera dependiente de *soj-spo0J*. En conjunto, todos estos resultados indican que el bacteriófago $\phi 29$ explota (parte) del sistema de segregación del cromosoma bacteriano para incorporar su genoma en el interior de la pre-espora.

Estudios de hace más de 30 años (Ito and Spizizen, 1972) demostraron que a medida que la célula infectada progresa en el proceso de esporulación, se va produciendo una inhibición de la transcripción del fago. Spo0A es un regulador transcripcional esencial para la entrada en esporulación. Experimentos, tanto *in vivo* como *in vitro* presentados en esta tesis, han mostrado que Spo0A es la proteína directamente responsable de la supresión del ciclo lítico del fago, debido, en parte, al efecto de Spo0A como regulador negativo de la transcripción de los principales promotores tempranos y al prevenir la activación del promotor tardío A3 de $\phi 29$. Los resultados obtenidos han demostrado que este efecto sobre la transcripción del fago no se debe a un efecto global sobre la transcripción por la entrada en esporulación, sino que Spo0A está actuando de manera específica sobre la transcripción de los principales promotores del fago. Además, Spo0A reprime los promotores del fago mediante distintos mecanismos. Por un lado, Spo0A reprime el promotor temprano A2c impidiendo la unión de la RNAP al mismo. La caja y semicaja 0A-1 solapan con la secuencia del promotor A2c por lo que la unión de Spo0A interfiere con la unión de la RNAP. Por otro lado, la unión de Spo0A a la región de la caja y semicaja 0A-3 impide la transcripción del promotor temprano A2b. También en este caso, Spo0A impide la unión de la RNAP. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en el promotor A2c, la caja y semicaja 0A-3 no solapan con la secuencia del promotor A2b, sino que están localizadas *upstream* del promotor (posiciones de la -54 a la -70 desde el inicio de la transcripción del promotor A2b). La RNAP se une de forma débil a este promotor temprano (Rojo and Salas, 1995) y su actividad es completamente dependiente de la presencia de un elemento UP (Meijer and Salas, 2004). Resultó muy interesante ver que la posición de este elemento UP coincide con la posición de la caja y semicaja 0A-3. Por tanto, el mecanismo de represión del promotor A2b por Spo0A es mediante la ocupación del elemento UP, necesario para la unión de α CTD y, por tanto, necesario para la unión de la RNAP al promotor. Que sepamos, esta fue la primera vez que se describió un mecanismo de represión transcripcional basado en la ocupación del elemento UP.

Spo0A también reprime el promotor temprano C2, pero mediante un mecanismo diferente a los ya descritos para los promotores A2b y A2c. En este caso, la caja y semicaja 0A-5 solapan parcialmente con la secuencia del promotor y con la del elemento UP. Sin embargo, la unión de Spo0A a estas (semi)cajas no interfiere con la unión de la RNAP al promotor, sino que se pueden unir las dos proteínas de forma simultánea. En esta situación, la RNAP no progresa a la formación del complejo abierto de transcripción, provocando la represión del promotor. Los dominios C- y N-terminal de la subunidad α de la RNAP están unidos a través de un *linker* flexible, lo que permite una cierta libertad de movimiento en la unión del α CTD a la región de DNA *upstream* del promotor correspondiente. Así, en presencia de reguladores transcripcionales, puede variar la posición en la que aparece unido el α CTD (Blatter et al., 1994; Jeon et al., 1997). La unión simultánea de Spo0A y RNAP en la región del promotor C2 provoca un cambio en el patrón de unión de α CTD a la región de este promotor (protección total de la posición -60 en presencia de Spo0A). Además, se ha demostrado que este cambio en la unión al DNA de α CTD es importante para la represión mediada por Spo0A de este promotor. α CTD puede interactuar con algunos reguladores transcripcionales (revisado en, Browning and Busby, 2004), por lo que sería posible que α CTD, unido a la posición -60, interaccionase con Spo0A, provocando una sobreestabilización de la unión de la RNAP al promotor.

Otro posible mecanismo que podría provocar la sobreestabilización de la unión de la RNAP al promotor C2 en presencia de Spo0A sería el siguiente. La proteína Spo0A es necesaria para la activación de la transcripción de los promotores dependientes del factor σ^A de *B. subtilis* *spoIIE* y *spoIIG*. Estos promotores se caracterizan por presentar sus cajas -10 y -35 separadas por 21 y 22 pb, respectivamente, en lugar de estar separadas por 17-18 pb como ocurre en los promotores reconocidos por σ^A -RNAP. Al igual que ocurre con el promotor temprano C2 de ϕ 29, sitios de unión de Spo0A solapan con la región promotora de estos genes (Satola et al., 1992; York et al., 1992). Diversos estudios muestran evidencias de que, en la activación mediada por Spo0A de los promotores *spoIIG* y *spoIIE*, están implicados contactos directos entre Spo0A y la subunidad σ^A de la RNAP (revisado en, Seredick and Spiegelman, 2001). Debido a la similitud en la organización del promotor C2 de ϕ 29 y la caja y semicaja 0A-5 con la organización de las (semi)cajas 0A en los promotores *spoIIE* y *spoIIG*, sería posible que Spo0A contactase con la subunidad σ^A de la RNAP unida al promotor C2.

Independientemente de cual sea el mecanismo molecular preciso, los resultados obtenidos muestran que la represión del promotor temprano C2 mediada por Spo0A se debe a una sobreestabilización del complejo cerrado de transcripción. La sobreestabilización podría ser debida a interacciones entre Spo0A y α CTD o a interacciones entre Spo0A y la subunidad σ^A de

la RNAP. Tampoco podemos descartar que la unión de Spo0A introduzca una curvatura en el DNA que provoque la sobreestabilización de la unión.

Por último, Spo0A previene la activación del promotor tardío A3 de $\phi 29$. La unión de Spo0A a la región de la caja y semicaja 0A-3, localizadas a aproximadamente 55 pb de la posición de inicio de la transcripción del promotor A3, interfiere con el reclutamiento de la RNAP al promotor, mediado por p4. El reclutamiento de la RNAP al promotor A3 tiene lugar a través de contactos directos entre el α CTD de la RNAP y p4 unida al sitio 3 (Mencía et al., 1993). Este mecanismo de activación, denominado de tipo I, no sólo suele implicar contactos entre α CTD y el activador transcripcional, sino que también suele implicar contactos entre α CTD y regiones del DNA próximas a la región a la que se une el activador (revisado en, Busby and Ebright, 1999; Browning and Busby, 2004). El promotor tardío A3 de $\phi 29$ no parece ser una excepción ya que en los ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I se observa que el α CTD se une a la región adyacente a la que se une p4 en el sitio 3 (posiciones -58 y -65 respecto del inicio de la transcripción del promotor A3, Mencía et al., 1996). La posición de la caja y semicaja 0A-3 solapa con el sitio de unión del α CTD en el promotor A3. Además, el sitio de unión de α CTD en el promotor A2b, crucial para la activación de este promotor temprano, coincide con el sitio de unión de Spo0A en la región de 0A-3. Por tanto, la unión de Spo0A a la región de la caja y semicaja 0A-3 reprime la transcripción del promotor A2b e interfiere con la activación, mediada por p4, del promotor A3, impidiendo, en ambos casos, la unión de α CTD.

En resumen, se ha demostrado cómo una proteína del huésped, la proteína Spo0A, está ejerciendo su función como regulador transcripcional no sólo sobre el DNA cromosómico de la bacteria, sino también sobre un elemento extra-cromosómico como es el genoma de $\phi 29$. Además, dado que Spo0A es el regulador esencial de entrada en esporulación y su expresión aumenta considerablemente al inicio del proceso, este mecanismo acopla la supresión del desarrollo del ciclo lítico del fago a la iniciación de la esporulación, confirmando así al fago una oportunidad única para sobrevivir a condiciones ambientales adversas. Mediante la represión de la transcripción de los genes cuyos productos son necesarios para completar su ciclo lítico, y mediante la explotación del mecanismo de segregación del cromosoma bacteriano, $\phi 29$ es capaz de incorporar su genoma en una de las estructuras más resistentes y duraderas de la naturaleza. Así, pospone el desarrollo de su ciclo lítico y, por tanto, la lisis del huésped, hasta que las condiciones sean mucho más favorables para una óptima propagación.

Kawamura e Ito (1974) encontraron que se produce una parada drástica de la replicación viral cuando las células infectadas entran en la fase de esporulación. Aunque este efecto sobre la replicación podría ser debido a la inhibición de la síntesis de proteínas necesarias para la replicación como consecuencia de la represión de la transcripción de los principales

promotores del fago mediada por Spo0A, consideramos la posibilidad de que Spo0A estuviese reprimiendo directamente la replicación del genoma de $\phi 29$. Esta hipótesis estaba basada en el hecho de que la inhibición de la transcripción del promotor temprano C2 por Spo0A requería la presencia de la caja y semicaja 0A-5, pero no la presencia de la caja 0A-6, localizada a 50 pb del extremo derecho del DNA de $\phi 29$. Dado que la replicación del DNA de $\phi 29$ comienza en ambos extremos del genoma mediante la formación de un complejo entre la proteína iniciadora de la replicación, p6, y el DNA, la unión de Spo0A a 0A-6 podría interferir con la iniciación de la replicación. Resultados de diversos ensayos, tanto *in vivo* como *in vitro*, han confirmado esta hipótesis. En estudios *in vivo* se ha observado que la replicación del genoma del fago es inhibida de una manera dependiente de *spo0A*. Por un lado, se ha observado que así como $\phi 29$ replica su genoma cuando infecta células crecidas en condiciones de esporulación de la estirpe 168:: $\Delta spo0A$, no se observa replicación de $\phi 29$ en células infectadas de la estirpe 168. Por otro lado, hemos visto que la replicación de $\phi 29$ es inhibida casi por completo cuando se infectan células vegetativas en las que se ha inducido la expresión del mutante de Spo0A, Spo0A-Sad67, que es activo de forma constitutiva. Aunque estos resultados implican a la proteína Spo0A en la inhibición de la replicación viral, no permiten distinguir si los efectos sobre la replicación son causados directamente por Spo0A o son debidos a la acción de otras proteínas cuya expresión esté bajo el control de Spo0A. Para distinguir entre estas posibilidades se llevaron a cabo ensayos *in vitro*. Así, se ha demostrado que Spo0A inhibe directamente la replicación del genoma de $\phi 29$ interfiriendo con el inicio de la replicación. Los ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I mostraron que Spo0A se une de manera específica a una región de aproximadamente 45 pb en ambos extremos del genoma de $\phi 29$. La región protegida del extremo derecho contiene la caja 0A-6 y 3 semicajas 0A adicionales, separadas unas de otras por 3 pb. La región protegida del extremo izquierdo no posee ninguna caja 0A; sin embargo, posee 4 semicajas 0A, separadas también por 3 pb. Lo que resulta muy interesante es que estas regiones protegidas coinciden con el sitio de nucleación de p6 (Serrano et al., 1989) y hemos mostrado que Spo0A interfiere con la formación del complejo nucleoproteico de iniciación de la replicación. La unión de Spo0A a los extremos del genoma de $\phi 29$ impide la unión de p6 e incluso desplaza un complejo p6-DNA previamente formado.

Por tanto, estos estudios han puesto de manifiesto el papel de Spo0A en la supresión del desarrollo de $\phi 29$, que no sólo se limita a la represión de la transcripción, sino que es capaz también de inhibir directamente la iniciación de la replicación del genoma del fago. A nivel mucho más general, estos estudios describen una nueva función de la proteína Spo0A: como regulador de la replicación. Como se discutirá más adelante, resultados obtenidos muestran que Spo0A ejerce un papel similar sobre la iniciación de la replicación del cromosoma de *B. subtilis*.

Tanto en su papel como regulador de la transcripción, como en su papel como inhibidor de la replicación, Spo0A está ejerciendo su acción uniéndose a regiones del DNA que presentan 2 (para la región de los promotores de $\phi 29$) ó 4 (para la región de los orígenes de replicación de $\phi 29$) (semi)cajas 0A separadas por 3 pb. Este tipo de organización hace que las cajas y/o (semi)cajas 0A queden colocadas en la misma cara de la doble hélice del DNA separadas exactamente por una vuelta de hélice. La información obtenida de la cristalización de un fragmento de DNA con dos cajas 0A separadas por 3 pb con dos dominios C-terminales de Spo0A unidos, junto con otros datos publicados, han definido este tipo de organización como la idónea para la unión de un dímero de Spo0A, que constituye la forma activa de la proteína (Strauch et al., 1990; Asayama et al., 1995; Lewis et al., 2002; Zhao et al., 2002; Ladds et al., 2003; Muchová et al., 2004; Chen et al., 2006). El análisis de varios genes de *B. subtilis* que son regulados directamente por Spo0A reveló una buena correlación entre la afinidad por Spo0A en ensayos *in vitro* y su respuesta a dosis altas o bajas de Spo0A *in vivo* (Fujita et al., 2005). En este mismo trabajo se caracterizaron los genes *abrB* y *skf* como pertenecientes al grupo que responde a bajas cantidades de Spo0A y que, por tanto, contienen sitios de unión de Spo0A de alta afinidad. Lo que resulta interesante es que los promotores *abrB* y *skf* presentan una organización de (semi)cajas 0A en tandem y separadas por 3 pb (Strauch et al., 1990; Chen et al., 2006). Dada la organización de las (semi)cajas 0A presentes en el genoma de $\phi 29$, cabía esperar que estos sitios fueran sitios de unión de Spo0A de alta afinidad. Mediante ensayos de retraso en gel se comprobó que las (semi)cajas 0A del genoma de $\phi 29$ presentan una afinidad por Spo0A similar a la que presenta el promotor *abrB*, a excepción de la región del origen izquierdo, que presente una afinidad intermedia a la que presentan *abrB* y *spoIIG*. En resumen, además de que las secuencias de las semicajas del genoma de $\phi 29$ son similares a la secuencia consenso de unión de Spo0A (5'-TGTCGAA-3'), es muy probable que la organización de las cajas separadas por 3 pb contribuya en gran medida a que constituyan sitios de unión de Spo0A de alta afinidad.

Todos estos resultados, la mayoría de ellos realizados mediante ensayos *in vitro*, han permitido establecer las bases moleculares de la estrategia de infección alternativa. Explotando (parte) del mecanismo de segregación del cromosoma bacteriano, mediante la proteína Spo0J, y mediante la supresión del desarrollo del ciclo lítico de $\phi 29$ mediado por Spo0A, el fago es capaz de incorporar su genoma en el interior de las esporas hasta que las condiciones ambientales sean idóneas para su desarrollo. Sin embargo, se sabía relativamente poco sobre los efectos de Spo0A sobre el desarrollo del fago *in vivo*. Recientemente, se ha descrito que, durante los primeros estadios de la esporulación, *spo0A* se expresa de una forma biestable. Así, aunque la mayor parte de las células en este estadio de crecimiento presentan expresión de *spo0A*, sólo una subpoblación de las mismas presenta niveles por encima del umbral necesario para activar genes

de esporulación tempranos (Chung et al., 1994; Veening et al., 2005). Además, la proteína Spo0A también es necesaria para el desarrollo de otros procesos de diferenciación anteriores al desarrollo de la esporulación como son la formación de biopelículas (Hamon and Lazazzera, 2001; Hamon et al., 2004; Veening et al., 2006) o la competencia (revisado en, Grossman, 1995a). Los genes implicados en estos procesos y que están regulados por Spo0A suelen ser sensibles a niveles bajos de Spo0A y contienen, generalmente, sitios de unión de Spo0A de alta afinidad. La heterogeneidad en la expresión de *spo0A* y el papel que juega Spo0A en procesos anteriores a la esporulación, nos hizo plantearnos el estudio del comportamiento del fago *in vivo* en diferentes estadios de crecimiento del huésped. No se observó lisis significativa de cultivos infectados durante los primeros estadios de la esporulación. En estas condiciones, se produce también una inhibición de la replicación del DNA del fago. Estos dos hechos eran dependientes de *spo0A* ya que la infección de la estirpe 168:: $\Delta spo0A$ sí generaba una lisis significativa y se observaba replicación del genoma viral. Por tanto, los niveles de Spo0A generados en los primeros estadios de la esporulación, tanto en la subpoblación con niveles altos de Spo0A como en la subpoblación que produce niveles más bajos, son suficientes para suprimir el desarrollo del fago. Tampoco se observaba una lisis completa cuando se infectaban las células al final de la fase de crecimiento logarítmico. En este estado de crecimiento, ya hay expresión de *spo0A* pero a niveles por debajo de los necesarios para activar los genes de esporulación tempranos. Esto indicaba que la inhibición del desarrollo de $\phi 29$ se produce con niveles de Spo0A inferiores a los necesarios para activar la expresión de los genes de esporulación tempranos. Esto encaja con los resultados de los retrasos en gel que sitúan a las cajas 0A del genoma de $\phi 29$ dentro del grupo que responde a niveles bajos de Spo0A. Sin embargo, lo más sorprendente de estos estudios fue la observación de que, cultivos infectados con $\phi 29$ durante la fase de crecimiento exponencial, generaban un patrón de lisis parcial de una manera dependiente de *spo0A*. Además, en estas condiciones, se observaba también una bajada en los niveles de replicación del fago de manera dependiente de *spo0A*. Esto sugería la existencia, durante la fase de crecimiento logarítmico, de una subpoblación de células que producen cantidades de Spo0A suficientes para inhibir el desarrollo del fago pero insuficientes para iniciar la esporulación. De hecho, los experimentos de microscopía de fluorescencia han demostrado que *spo0A* se expresa de forma heterogénea durante la fase de crecimiento exponencial. Por tanto, *spo0A* se expresa de manera heterogénea tanto durante la fase de crecimiento estacionario como durante la fase de crecimiento exponencial, aunque los niveles máximos de expresión son inferiores durante la fase logarítmica. Probablemente esta respuesta de $\phi 29$ a niveles bajos de *spo0A* se deba a la combinación de la presencia de sitios de alta afinidad en el genoma de $\phi 29$ y a la acción de Spo0A tanto a nivel de represión de la transcripción como a nivel de inhibición de la replicación.

Los resultados obtenidos muestran que la biestabilidad de *spo0A* durante la fase de crecimiento exponencial es dependiente de KinC y, en menor medida, de KinD. KinA y KinB están consideradas las quinasas responsables de la generación de los niveles altos de Spo0A necesarios para iniciar la esporulación (Perego et al., 1989; Trach and Hoch, 1993; LeDeaux and Grossman, 1995). Se ha descrito que el gen *abrB*, que pertenece al grupo que responde a cantidades bajas de Spo0A, se expresa por debajo de su máximo de expresión durante el crecimiento vegetativo de células de la estirpe wt, en comparación con los niveles de expresión que se alcanzan en células mutantes que no activan la cascada de fosfatos involucrada en la activación de Spo0A por fosforilación (Perego et al., 1988; Trach and Hoch, 1993). Niveles de expresión por debajo de los niveles máximos también se observan en células mutantes en los genes *kinA*, *kinB* o *kinE*. Sin embargo, los niveles de expresión de *abrB* son más altos en mutantes de los genes *kinC* o *kinD*, y niveles máximos de expresión de *abrB* se alcanzan en ausencia de ambas quinasas (Trach and Hoch, 1993; LeDeaux and Grossman, 1995; Jiang et al., 2000). Todos estos resultados apuntaban a que KinC y KinD son las quinasas responsables de la generación de los niveles de Spo0A activa que provocan una represión parcial de la expresión de *abrB* durante la fase de crecimiento exponencial.

Hamon y Lazazzera (2001) llegaron a una conclusión similar estudiando los mecanismos moleculares implicados en la formación de biopelículas de células de *B. subtilis*. Las biopelículas son comunidades estructuradas de células asociadas a superficies en las cuales las células se encuentran rodeadas de una matriz polimérica. La formación de biopelículas por parte de *B. subtilis* es dependiente de Spo0A y de la cascada de fosfatos que provoca su activación, pero no del proceso de esporulación en sí (Hamon and Lazazzera, 2001; Branda et al., 2001; Veening et al., 2006). El defecto en la formación de biopelículas que presenta una estirpe mutante en *spo0A*, se subsana, en gran parte, con una mutación adicional en *abrB* (Hamon and Lazazzera, 2001). Este y otros resultados sugieren que *abrB* funciona como represor de la formación de biopelículas y que el papel que juega Spo0A en la formación de biopelículas es a través de la represión de *abrB*, lo que lleva a la expresión de los genes implicados en el proceso (Hamon and Lazazzera, 2001; Hamon et al., 2004; Kearns et al., 2005). Hamon y Lazazzera (2001) también demostraron que, mientras que mutaciones en los genes *kinA* y *kinB* no tienen ningún efecto sobre la formación de biopelículas, mutaciones en los genes *kinC*, *kinD* o *kinE*, sí afectan a la formación de las biopelículas. Esto indicaba que estas tres últimas quinasas son las responsables de la generación de los niveles de Spo0A activa necesarios para la represión de *abrB* y, por tanto, necesarios para la formación de biopelículas.

En conjunto, varios estudios independientes han demostrado que la expresión de *abrB* es reprimida parcialmente de una manera dependiente de *kinC*, *kinD*, y en algunas condiciones, también de *kinE*, lo que sugiere que estas quinasas son las responsables de generar los niveles

de Spo0A activa necesarios para reprimir parcialmente la expresión de *abrB*. Los resultados presentados en esta tesis dan pruebas directas de que los niveles de Spo0A activa que se observan durante la fase de crecimiento exponencial en una subpoblación de células son dependientes de KinC y en menor medida de KinD. En cultivos de estas estirpes, especialmente en la estirpe que posee una delección del gen *kinC*, infectados durante la fase de crecimiento exponencial, se pierde el patrón de lisis parcial dependiente de *spo0A* que se observa tras la infección de la estirpe isogénica silvestre. En los estudios mencionados anteriormente, se medía la expresión de *abrB* en cultivos completos, lo que generaba unos valores de expresión medio de todas las células del cultivo (Trach and Hoch, 1993; LeDeaux and Grossman, 1995; Jiang et al., 2000). La estirpe 0A/IIA permite, sin embargo, la visualización de los niveles de expresión de *spo0A* en células individuales. Así, en los ensayos de microscopía de fluorescencia presentados en esta tesis, se muestra que *spo0A* se expresa de forma heterogénea durante la fase de crecimiento exponencial. Probablemente, esto haga que, durante la fase de crecimiento exponencial, la expresión de *abrB* esté muy reprimida en algunas células y no o muy poco reprimida en otras. Atendiendo a este punto, es importante resaltar que la formación de biopelículas probablemente sea un proceso biestable ya que, en las condiciones idóneas para la generación de biopelículas, se observan subpoblaciones de células en estado sésil y mótil (revisado en, Graumann, 2006; Chai et al., 2007).

Por tanto, los niveles bajos de transcripción de *spo0A* que se observan en una subpoblación de células durante la fase de crecimiento logarítmico son, por un lado, suficientes para suprimir el desarrollo del bacteriófago $\phi 29$ y, por otro, son capaces de activar la formación de biopelículas reprimiendo la expresión de *abrB* (Hamon and Lazazzera, 2001). Esto sugiere que en las células que forman parte de las biopelículas, el desarrollo de $\phi 29$ estaría inhibido. Dado que las biopelículas son la forma de vida predominante de las bacterias en la naturaleza (Costerton et al., 1995), estos resultados pueden tener importantes implicaciones para el estilo de vida de $\phi 29$. Como se ha explicado anteriormente, la supresión por medio de Spo0A del ciclo lítico del fago es un paso crucial para la incorporación del genoma del fago en el interior de la pre-espora cuando se infectan células que se encuentran en los primeros estadios de la esporulación. Estos últimos resultados sugieren que la represión del ciclo lítico del fago por Spo0A es también importante cuando se infectan células en condiciones de formación de biopelículas. En relación con este punto, es importante comentar que se ha descrito que algunos fagos son capaces de entrar en un estado de pseudolisogenia cuando infectan biopelículas y que probablemente las biopelículas constituyan una estrategia importante para la supervivencia del fago en la naturaleza (revisado en, Sutherland et al., 2004).

$\phi 29$ pertenece a una familia de fagos que está dividida en tres grupos y se cree que todos provienen de un antecesor común. Al contrario que el único representante del grupo 3, todos los

miembros de los grupos 1 y 2 infectan *B. subtilis*. Otro objetivo importante de esta tesis fue estudiar si la adaptación al estado de crecimiento de la célula que desarrolla $\phi 29$ está conservada en otros fagos pertenecientes a la misma familia y, en concreto, si está conservado en el bacteriófago Nf, perteneciente al grupo 2.

Los resultados obtenidos de estudios *in vivo* muestran que Nf es menos sensible que $\phi 29$ a la supresión de su desarrollo por Spo0A. Primero, al contrario que $\phi 29$, Nf produce placas de lisis pequeñas pero visibles sobre la estirpe silvestre 168 de *B. subtilis*. En segundo lugar, cultivos infectados con Nf durante la fase de crecimiento exponencial generan un patrón de lisis mucho más generalizado, en contraposición con el patrón de lisis parcial que se observa tras la infección con $\phi 29$. Además, los niveles de replicación del DNA de Nf observados tras la infección de células de la estirpe 168 son muy similares a los que se obtienen tras la infección de la estirpe 168:: $\Delta spo0A$, lo que indica que la replicación de Nf no es inhibida o es inhibida en menor extensión, en células en fase logarítmica. Finalmente, la replicación del genoma de Nf es inhibida de una forma más leve que la de $\phi 29$ durante la infección de cultivos en fase estacionaria.

Como primer abordaje para dilucidar los mecanismos que establecen estas diferencias de comportamiento, se secuenció el genoma completo de Nf. La identidad global de las secuencias de DNA de $\phi 29$ y Nf es de un 64%. La organización genética y transcripcional de Nf es muy similar a la de $\phi 29$. El genoma de Nf es 532 pb menor que el de $\phi 29$, lo cual es debido, en parte, a la ausencia en el genoma de Nf de la región que corresponde a la fase de lectura abierta 1C en $\phi 29$. El genoma de Nf contiene dos fases de lectura abierta adicionales denominadas e y g. Dado que los dos fagos se comportan de forma muy similar cuando infectan la estirpe 168:: $\Delta spo0A$, no parece probable que las diferencias de comportamiento encontradas tras la infección de la estirpe 168 sean debidas a las diferencias a nivel de las fases de lectura abierta e y g, y 1C. Lo más probable, es que sean debidas a diferencias en cuanto al número de cajas 0A presentes en ambos genomas. Así, mientras que el genoma de $\phi 29$ presenta 6 cajas 0A, el genoma de Nf presenta únicamente 1, la caja 0A-3', cuya posición en el genoma de Nf es equivalente a la de la caja 0A-3 del genoma de $\phi 29$. En $\phi 29$ se ha demostrado que la unión de Spo0A a esta caja y a la semicaja localizada a 3 pb provoca, por un lado, la represión del promotor temprano A2b y, por otro, previene la activación del promotor tardío A3, mediada por p4. Debido a la similitud en la posición de esta caja en el genoma de Nf, cabría esperar que Spo0A ejerciera el mismo papel regulador en Nf. La ausencia de secuencias similares a la de las cajas 0A en las proximidades del resto de los promotores de Nf, sugería que Spo0A no estaría ejerciendo ningún efecto sobre los mismos, lo que podría explicar, por lo menos en parte, las diferencias de comportamiento observadas entre $\phi 29$ y Nf.

De acuerdo con la información deducida del análisis de la secuencia del genoma de Nf, hemos visto que Spo0A no afecta a la transcripción del promotor temprano C2 de Nf. Sin embargo, este mismo tipo de ensayo mostró que la transcripción del promotor temprano A2c de Nf es inhibida de una manera dependiente de Spo0A. Los ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I en presencia de Spo0A demostraron que la proteína se une a una región que comprende gran parte del promotor A2c. El análisis de la secuencia del genoma de Nf en las proximidades del promotor temprano A2c, reveló la presencia de dos semicajas 0A (cada una con un nucleótido desviado de la secuencia consenso de unión de Spo0A), separadas por 3 pb. Estas semicajas están localizadas en posiciones equivalentes a la de la caja y semicaja 0A-1 del genoma de ϕ 29. Mediante ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I, en presencia de RNAP y en presencia o ausencia de Spo0A, vimos que la unión de Spo0A a esta región impide la unión de la RNAP al promotor temprano A2c de Nf. Por tanto, Spo0A reprime la transcripción de este promotor temprano, tanto en ϕ 29 como en Nf, impidiendo la unión de la RNAP. Como se ha comentado, la caja 0A-3 está conservada en el genoma de ambos fagos. En ambos genomas, esta caja está situada a una distancia de 40 pb *upstream* de la caja -10 del promotor tardío A3 y a una distancia de 27 y 26 pb *upstream* de la caja -35 del promotor temprano A2b de Nf y ϕ 29, respectivamente. Los resultados de los ensayos *in vitro* han mostrado que Spo0A se une a la región de la caja 0A-3' del genoma de Nf y que, al igual que en ϕ 29, esta unión interfiere con el reclutamiento de la RNAP al promotor tardío, mediado por p4. Sin embargo, mientras que en ϕ 29 la unión de Spo0A a esta caja reprime también la transcripción del promotor A2b, los ensayos de transcripción *in vitro* muestran que Spo0A sólo provoca una leve represión del promotor A2b de Nf a las concentraciones más altas de Spo0A utilizadas. Además, la unión de Spo0A sólo afecta a la unión de la RNAP al promotor a las concentraciones más altas utilizadas, lo que está de acuerdo con los resultados de la transcripción *in vitro*. Estos resultados eran un poco sorprendentes debido a la presencia en el genoma de Nf de una caja equivalente a la caja 0A-3 del genoma de ϕ 29. Un análisis comparativo de la unión de Spo0A a la región de la caja 0A-3 y 0A-3' del genoma de ϕ 29 y Nf, respectivamente, mostró que en ambos casos Spo0A se une a la caja 0A-3 o 0A-3' y a una semicaja separada por 3 pb. Sin embargo, la posición de la semicaja es diferente en el genoma de ambos fagos. En el genoma de ϕ 29 la semicaja 0A-3 está situada en la región próxima al promotor A2b. En el genoma de Nf la semicaja 0A-3' está localizada al otro lado de la caja 0A-3', es decir, en la región próxima al promotor A3. En ambos genomas, la semicaja presenta 4 nucleótidos idénticos a los de la secuencia consenso. En la Tabla 10 se presenta un alineamiento de la caja 0A-3 y 0A-3' junto con las secuencias flanqueantes. Esta distinta localización de las semicajas 0A-3 y 0A-3' probablemente explique las diferencias encontradas a nivel de la

represión del promotor A2b por Spo0A entre ambos fagos. Desde nuestro punto de vista, este resultado es muy interesante ya que no sólo refleja que cambios pequeños a nivel de la unión de una proteína al DNA pueden implicar cambios drásticos a nivel de la regulación de la transcripción, sino que esta pequeña diferencia a nivel de localización de la semicaja también condiciona un comportamiento diferente de dos fagos relacionados como son $\phi 29$ y Nf.

Tabla 10. Alineamiento de las cajas 0A-3 y 0A-3' del genoma de $\phi 29$ y Nf, respectivamente y de las secuencias flanqueantes

	Secuencia (5' - 3')
Nf	4790-AAAa GT Tt At Gaaa TCGACA Aat tacCGC ATAAC-4824
$\phi 29$	5117-AAAt GT TgacGttt TCGACA AgaacgCc CA cAAa-5151

Los números corresponden a las posiciones en los genomas de cada uno de los fagos. La secuencia consenso de unión de Spo0A (5'-TGTCGAA-3') está indicada en letras negritas rojas. La semicaja flanqueante separada por 3 pb en Nf y $\phi 29$ está subrayada en gris con los pb idénticos a los de la secuencia consenso indicados en negrita. Las letras minúsculas indican los pb diferentes en la secuencia de ambos fagos.

En $\phi 29$, Spo0A regula el desarrollo del fago también a nivel de la replicación. Así, al unirse a los extremos del genoma de $\phi 29$, interfiere con la unión de la proteína p6 a los mismos, interfiriendo con la formación del complejo nucleoproteico de iniciación de la replicación. Sin embargo, al contrario que en $\phi 29$, se observan niveles altos de replicación del genoma de Nf cuando se infectan células en los primeros estadios de la esporulación, estado de crecimiento en el que existen niveles altos de Spo0A en las células. Estos resultados *in vivo* son acordes con los resultados obtenidos de ensayos *in vitro*. Aunque se ha demostrado que Spo0A se une *in vitro* a los extremos del genoma de Nf, y que la región protegida en ambos extremos presenta una organización de semicajas 0A separadas por 3 pb similar a la de los extremos del genoma de $\phi 29$, Nf sólo presenta dos semicajas en cada origen de replicación y están localizadas más cerca de los extremos que en $\phi 29$. Además, Spo0A no interfiere prácticamente con la formación del complejo p6-DNA. Por último, no se ha visto efecto significativo de Spo0A sobre la iniciación de la replicación *in vitro* de Nf con el rango de concentración de Spo0A utilizado que anulan por completo la formación del complejo p6-DNA en los extremos del genoma de $\phi 29$.

En resumen, los datos obtenidos de los ensayos *in vitro* concuerdan con el comportamiento del bacteriófago Nf *in vivo*. Al no producirse represión mediada por Spo0A del promotor temprano C2, y sólo de manera muy leve, la del promotor A2b, continúan expresándose las proteínas virales, aunque probablemente en menor cantidad, por lo que el fago puede seguir replicando su genoma. El hecho de que Spo0A se una a los extremos del genoma

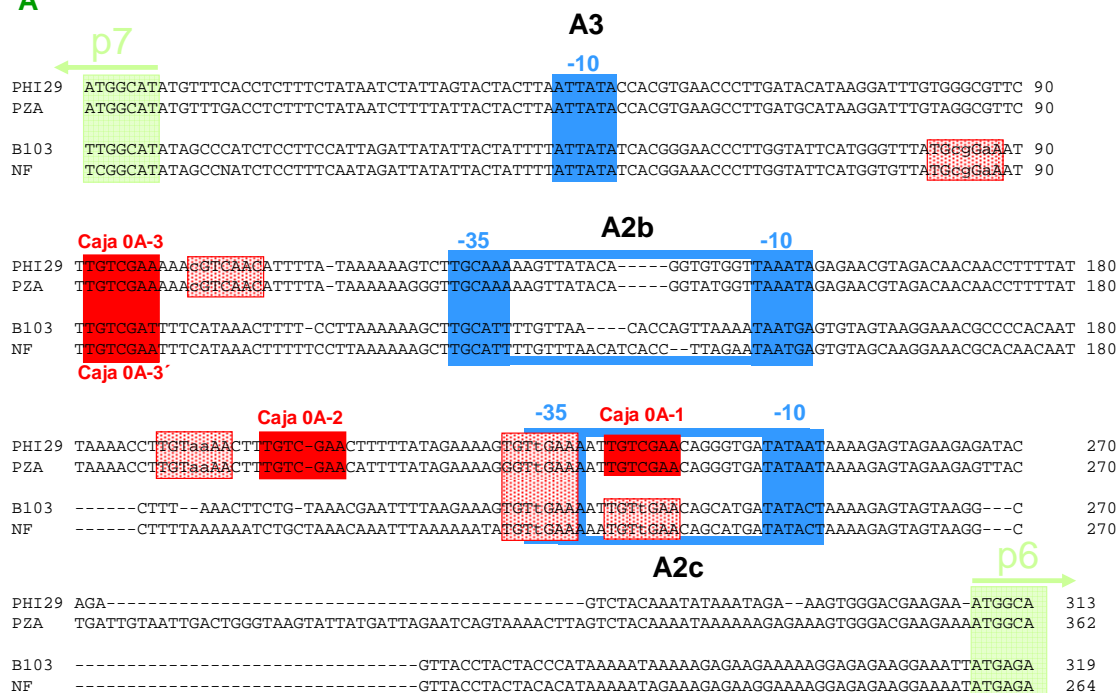
de Nf, implica la posibilidad de que afecte a la iniciación de la replicación *in vivo*. En los ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I de los extremos del genoma de Nf se observa que, a la concentración más alta de Spo0A utilizada, la unión de la proteína p6 se ve afectada. Por tanto, no se puede descartar la posibilidad de que, en células infectadas durante la fase de crecimiento estacionario, en la subpoblación de células con niveles más altos de expresión de *spo0A*, Spo0A esté inhibiendo la replicación del DNA de Nf *in vivo*.

Todos estos datos apuntan en la dirección de una diferente evolución de los bacteriófagos Nf y $\phi 29$. Existen varias posibilidades que podrían explicar la diferente evolución de ambos fagos. Una explicación podría ser consecuencia de la adaptación de los fagos a un distinto estado fisiológico en que se encuentra mayoritariamente el huésped en la naturaleza. Los fagos de los grupos 1 y 2 fueron aislados de lugares geográficamente muy distantes (Grupo 1 en Estados Unidos, Grupo 2 en Japón). Una diferente localización geográfica implica condiciones ambientales distintas lo que condicionaría un distinto estado de crecimiento en el que usualmente se encuentren las células.

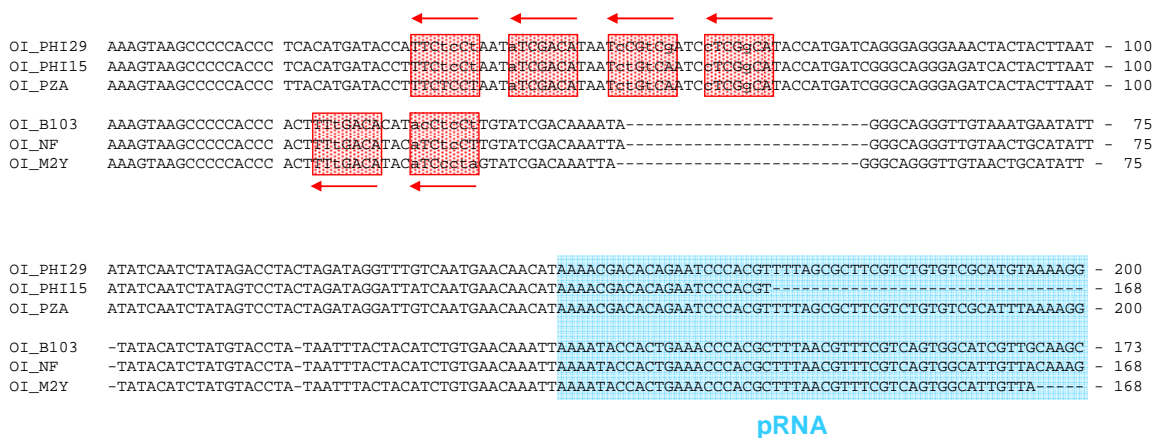
En conjunto, los resultados obtenidos han mostrado cómo un fago es capaz de adaptarse al estado fisiológico en el que se encuentra la célula infectada al poseer en su genoma sitios de unión para un regulador del huésped. Además, los resultados también han mostrado que, el distinto comportamiento que presentan fagos relacionados, es debido a diferencias sutiles en cuanto al número y/o posición en el genoma de sitios de unión del regulador.

Probablemente, las diferencias de comportamiento observadas entre estos dos fagos sean extrapolables a otros fagos de los grupos 1 y 2 dado que presentan una organización de (semi)cajas 0A similar como muestran los alineamientos de las regiones del genoma correspondientes a la región de los promotores A2c-A3 y de los extremos derechos e izquierdos, presentados en la Figura 45. No obstante, esto no excluye la posibilidad de que haya diferencias sutiles en cuanto a la regulación por Spo0A entre fagos pertenecientes a un mismo grupo. De hecho, en un artículo antiguo mencionan que el desarrollo del bacteriófago $\phi 15$, perteneciente al mismo grupo que $\phi 29$, es todavía más sensible a Spo0A que el propio $\phi 29$, aún presentando la misma organización de (semi)cajas 0A que $\phi 29$, al menos en la región de los extremos del genoma (Ito et al., 1973) (ver Figura 45B y C).

A



B



C

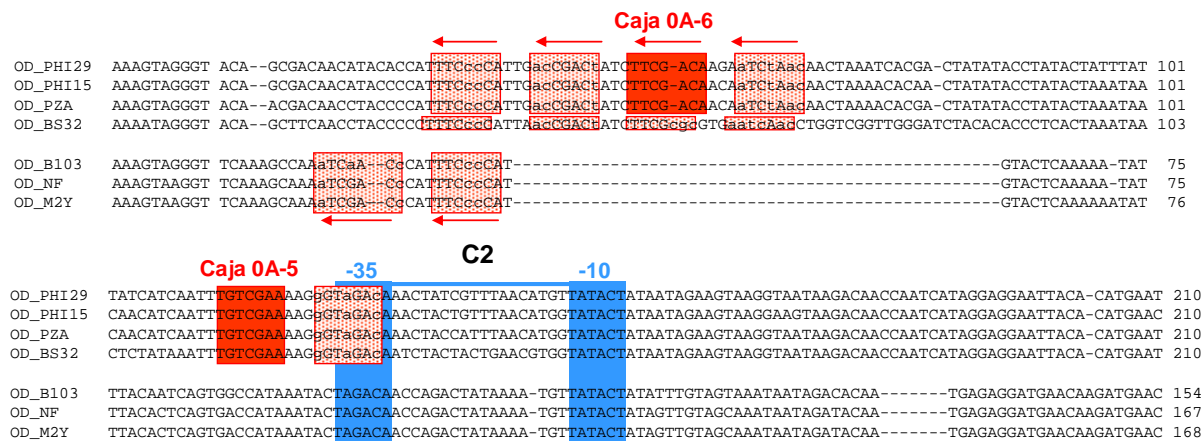


Figura 45. Alineamientos de las regiones de los promotores A2c-A3 (A), de los extremos izquierdos (B) y de los extremos derechos (C) de los genomas de algunos de los fagos de los grupos I (ϕ 29, ϕ 15, PZA y BS32) y grupo II (NF, M2Y y B103) de la familia de ϕ 29. Las (semi)cajas 0A están indicadas mediante rectángulos rojos y punteados, respectivamente. Los nucleótidos desviados respecto de la secuencia consenso de unión de Spo0A en las semicajas están indicados mediante letras minúsculas. Las cajas -10 y -35 de los distintos promotores están indicadas mediante rectángulos azules.

El hallazgo del nuevo papel de Spo0A como inhibidor de la replicación del DNA de ϕ 29, nos hizo plantearnos si estaría ejerciendo una función similar sobre el inicio de la replicación del cromosoma de *B. subtilis*. ¿Cuál sería el significado biológico de la inhibición de la replicación por Spo0A? Durante los primeros estadios de la esporulación, la célula posee dos y sólo dos copias del cromosoma bacteriano. Una de ellas será segregada al interior de la pre-espora y la otra a la célula madre (revisado en, Errington, 2001; Piggot and Losick, 2002). Por tanto, las células que han iniciado la esporulación no sólo deben terminar una última ronda de replicación, sino que tienen que evitar el inicio de nuevas rondas. Así, mediante la activación de la esporulación y previniendo el inicio de nuevas rondas de replicación, Spo0A estaría acoplando los dos procesos asegurando la coordinación necesaria entre los mismos, esencial para la formación de las esporas.

Fujita y Losick (2005) vieron que se podía alcanzar una eficaz producción de esporas activando artificialmente la cascada de fosforilación que lleva a la activación de Spo0A, en concreto, mediante la sobreexpresión de KinA, en células en fase de crecimiento exponencial. Las células en fase exponencial crecidas en un medio rico, generalmente poseen múltiples horquillas de replicación, lo cual sería incompatible con la entrada en esporulación. Por tanto, estos autores sugerían que Spo0A podría estar previniendo la iniciación de nuevas rondas de replicación. Además, la región del *oriC* de *B. subtilis* posee una caja 0A y Spo0A se une *in vivo* a la región del *oriC* (Molle et al., 2003). Y por último, la secuencia consenso de unión de Spo0A es similar a la de la secuencia consenso de unión de DnaA en la cadena complementaria.

Mediante ensayos de protección del DNA a la digestión con DNasa I encontramos que Spo0A se une a las regiones de *incA* e *incB* del *oriC*. El análisis de las regiones protegidas por Spo0A en la región de *incB* reveló que posee una organización de (semi)cajas 0A muy similar a la que presentan los extremos del genoma de ϕ 29. Además, resultó muy interesante que, excepto para la región protegida de aproximadamente 40 pb cercana a la región de repeticiones de 16 pb de *incA*, el resto de las regiones a las que se une Spo0A solapan con semicajas de DnaA. El hecho de que las protecciones generadas por Spo0A solapasen con sitios de unión de la proteína DnaA, sugería que Spo0A podría estar impidiendo, al igual que en ϕ 29, la formación del complejo nucleoproteico iniciador de la replicación del cromosoma de *B. subtilis*. Los ensayos

mostrados de sensibilidad al tratamiento con KMnO_4 demostraron que, efectivamente Spo0A inhibe la formación del complejo abierto necesario para la iniciación de la replicación del cromosoma de *B. subtilis*.

El mecanismo de iniciación de la replicación del DNA de *B. subtilis* es similar al del plásmido R6K y al del virus Epstein-Barr (EBV) (revisado en, Moriya et al., 1999). En estos genomas, la unión de la proteína iniciadora de la replicación a dos regiones distantes en los orígenes de replicación, provoca la formación de un bucle entre las dos regiones que es necesario para la apertura de la doble hélice del DNA (Frappier and O'Donnell, 1991; Su et al., 1991; Miron et al., 1992). La proteína iniciadora de la replicación del plásmido R6K y del EBV presenta marcadas diferencias en la afinidad de unión a cada una de las dos regiones. En ambos casos, la proteína iniciadora de la replicación posee una afinidad menor por la región más próxima a la zona de apertura de la doble hélice. Además, en ambos casos, se ha demostrado que la unión de la proteína iniciadora a la región de mayor afinidad estabiliza la unión a los sitios de menor afinidad mediante la formación del bucle (Miron et al., 1992; Frappier et al., 1994). La situación en el *oriC* de *B. subtilis* es similar, ya que la proteína DnaA presenta mayor afinidad en la unión a la región de *incB* (Fukuoka et al., 1990; Krause et al., 1997), y, como consecuencia, esta región es la que presenta mayor incompatibilidad con la replicación del cromosoma cuando está presente en un plásmido de alto número de copias (Moriya et al., 1988). Por homología con el mecanismo de iniciación de la replicación del plásmido R6K y del EBV, lo más probable es que las regiones de *incA* e *incB* del *oriC* de *B. subtilis* estabilicen la unión de DnaA a la región de *incC* permitiendo la formación del complejo abierto en la región de 27 pb rica en bases AT de *incC*. Los resultados obtenidos muestran que Spo0A se une a las regiones de *incA* e *incB* y que inhibe la formación del complejo abierto de iniciación de la replicación. Estos datos indican fuertemente que Spo0A inhibe el inicio de la replicación interfiriendo con la formación del complejo nucleoproteico mediado por DnaA en el *oriC*, necesario para la formación del complejo abierto de replicación.

El hecho de que Spo0A reprima la transcripción del gen *dnaA* estaría, además, contribuyendo a la inhibición de la replicación al disminuir la cantidad de DnaA presente en las células. Por tanto, de manera similar a lo que ocurre en $\phi 29$, Spo0A inhibe la replicación del cromosoma de *B. subtilis* actuando a dos niveles: por un lado, reprimiendo directamente el inicio de la replicación, y por otro lado, reprimiendo la síntesis de la proteína iniciadora DnaA.

En conjunto, todos estos resultados, además de ahondar en las bases moleculares de la estrategia de infección alternativa que desarrolla $\phi 29$ y las diferencias con Nf ha permitido ampliar el conocimiento sobre aspectos del desarrollo de la bacteria *B. subtilis*. Esto pone de manifiesto cómo, el estudio de sistemas modelo básicos, como es $\phi 29$, facilita y amplía el conocimiento de sistemas más complicados.

Conclusiones

- 1.- Las secuencias *parS* del genoma de $\phi 29$ son sitios funcionales de unión de Spo0J y están implicados en la incorporación del genoma del fago en la pre-espora.
- 2.- El regulador esencial de entrada en esporulación de *B. subtilis*, Spo0A, es el responsable de la supresión del desarrollo del fago $\phi 29$.
- 3.- Spo0A reprime la transcripción de los promotores tempranos A2c, A2b y C2 de $\phi 29$ mediante distintos mecanismos e inhibe la activación del promotor tardío A3 mediada por p4.
- 4.- Spo0A se une a los extremos del genoma de $\phi 29$ interfiriendo con la formación del complejo p6-DNA, inhibiendo, por tanto, la iniciación de la replicación del genoma del fago.
- 5.- Las (semi)cajas 0A del genoma de $\phi 29$ constituyen sitios de unión de Spo0A de afinidad relativa alta.
- 6.- La proteína Spo0A presenta un patrón de expresión biestable no sólo durante la esporulación sino también durante la fase de crecimiento exponencial. El patrón de expresión biestable de Spo0A durante la fase de crecimiento exponencial depende de KinC y en menor medida de KinD.
- 7.- El patrón biestable de Spo0A durante la fase de crecimiento exponencial es responsable de la supresión del desarrollo de $\phi 29$ en una subpoblación de células infectadas durante la fase de crecimiento vegetativo.
- 8.- El desarrollo del bacteriófago Nf, perteneciente al grupo 2 de la familia de fagos de $\phi 29$, es menos susceptible a la supresión de su ciclo lítico por Spo0A que $\phi 29$.
- 9.- Al contrario que en $\phi 29$, Spo0A no reprime la transcripción del promotor temprano C2 y sólo levemente la del promotor temprano A2b de Nf. Spo0A no inhibe la iniciación de la replicación del DNA de Nf *in vitro* y apenas interfiere con la formación del complejo iniciador de la replicación p6-DNA, al contrario de lo que ocurre en $\phi 29$.
- 10.- Spo0A inhibe la formación del complejo abierto de iniciación de la replicación del cromosoma de *B. subtilis* mediado por DnaA y reprime la expresión de la proteína iniciadora de la replicación DnaA.

Bibliografía

Bibliografía

- Abeles, A., Friedman, S.A., and Austin, S.J. (1985). Partition of unit copy miniplasmids to daughter cells. III. The DNA sequence and functional organisation of the P1 partition region. *J. Mol. Biol.* *185*, 261-272.
- Abril, A.M., Salas, M., Andreu, J.M., Hermoso, J.M., and Rivas, G. (1997). Phage ϕ 29 protein p6 is in a monomer-dimer equilibrium that shifts to higher association states at the millimolar concentrations found *in vivo*. *Biochemistry* *36*, 11901-11908.
- Ackermann, H.-W. (1998). Tailed bacteriophages: the order *Caudovirales*. *Adv. Virus Res.* *51*, 135-201.
- Albert, A., Munoz-Espin, D., Jimenez, M., Asensio, J.L., Hermoso, J.A., Salas, M., and Meijer, W.J.J. (2005). Structural Basis for Membrane Anchorage of Viral ϕ 29 DNA during Replication. *J. Biol. Chem.* *280*, 42486-42488.
- Alcorlo, M., Gonzalez-Huici, V., Hermoso, J.M., Meijer, W.J.J., and Salas, M. (2007). The Phage ϕ 29 Membrane Protein p16.7, Involved in DNA Replication, Is Required for Efficient Ejection of the Viral Genome. *J. Bacteriol.* *189*, 5542-5549.
- Asayama, M., Yamamoto, A., and Kobayashi, Y. (1995). Dimer form of phosphorylated Spo0A, a transcriptional regulator, stimulates the *spo0F* transcription at the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* *250*, 11-23.
- Attila Becskei, B.S.a.L.S. (2001). Positive feedback in eukaryotic gene networks: cell differentiation by graded to binary response conversion. *EMBO J.* *20*, 2528-2535.
- Badía, D., Camacho, A., Pérez-Lago, L., Escandón, C., Salas, M., and Coll, M. (2006). The Structure of Phage ϕ 29 Transcription Regulator p4-DNA Complex Reveals an N-Hook Motif for DNA Binding. *Molecular Cell* *22*, 73-81.
- Baker, T.A. and Bell, S.P. (1998). Polymerases and the replisome: machines within machines. *Cell* *92*, 295-305.
- Barak, I., Prepiak, P., and Schmeisser, F. (1998). MinCD Proteins Control the Septation Process during Sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *180*, 5327-5333.
- Barak, I. and Wilkinson, A.J. (2007). Division site recognition in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews* *31*, 311-326.
- Barthelemy, I., Mellado, R.P., and Salas, M. (1989). *In vitro* transcription of bacteriophage ϕ 29 DNA: inhibition of early promoters by the viral replication protein p6. *J. Virol.* *63*, 460-462.
- Barthelemy, I. and Salas, M. (1989). Characterization of a new prokaryotic transcriptional activator and its DNA recognition site. *J. Mol. Biol.* *208*, 225-232.
- Barthelemy, I., Salas, M., and Mellado, R.P. (1987). *In vivo* transcription of bacteriophage ϕ 29 DNA: transcription termination. *J. Virol.* *61*, 1751-1755.
- Barthelemy, I., Mellado, R.P., and Salas, M. (1988). Symmetrical transcription in bacteriophage ϕ 29 DNA. *Biochimie* *70*, 605-609.

- Ben Yehuda,S., Fujita,M., Liu,X.S., Gorbatyuk,B., Skoko,D., Yan,J., Marko,J.F., Liu,J.S., Eichenberger,P., Rudner,D.Z., and Losick,R. (2005). Defining a Centromere-like Element in *Bacillus subtilis* by Identifying the Binding Sites for the Chromosome-Anchoring Protein RacA. *Molecular Cell* 17, 773-782.
- Ben-Yehuda,S., Rudner,D.Z., and Losick,R. (2003). RacA, a bacterial protein that anchors chromosomes to the cell poles. *Science* 299, 532-536.
- Blanco,L., Bernad,A., Lázaro,J.M., Martín,G., Garmendia,C., and Salas,M. (1989). Highly efficient DNA synthesis by the phage ϕ 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J. Biol. Chem.* 264, 8935-8940.
- Blanco,L., Gutiérrez,J., Lázaro,J.M., Bernad,A., and Salas,M. (1986). Replication of phage ϕ 29 DNA *in vitro*: role of the viral protein p6 in initiation and elongation. *Nucleic Acids Res.* 14, 4923-4937.
- Blanco,L., Lázaro,J.M., De Vega,M., Bonnin,A., and Salas,M. (1994). Terminal protein-primed DNA amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12198-12202.
- Blanco,L., Prieto,I., Gutiérrez,J., Bernad,A., Lázaro,J.M., Hermoso,J.M., and Salas,M. (1987). Effect of NH_4^+ ions on ϕ 29 DNA-protein p3 replication: formation of a complex between the terminal protein and the DNA polymerase. *J. Virol.* 61, 3983-3991.
- Blanco,L. and Salas,M. (1984). Characterization and purification of a phage ϕ 29-encoded DNA polymerase required for the initiation of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5325-5329.
- Blanco,L. and Salas,M. (1985). Replication of phage ϕ 29 DNA with purified terminal protein and DNA polymerase: synthesis of full length DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6404-6408.
- Blatter,E.E., Ross,W., Tang,H., Gourse,R.L., and Ebright,R.H. (1994). Domain organization of RNA polymerase alpha subunit: C-terminal 85 amino acids constitute a domain capable of dimerization and DNA binding. *Cell* 78, 889-896.
- Bouet,J.-Y. and Funnell,B.E. (1999). P1 ParA interacts with the P1 partition complex at *parS* and an ATP-ADP switch controls ParA activities. *EMBO J. Mar* 1, 1415-1424.
- Boye,E., Stokke,T., Kleckner,N., and Skarstad,K. (1996). Coordinating DNA replication initiation with cell growth: Differential roles for DnaA and SeqA proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 12206-12211.
- Branda,S.S., Gonzalez-Pastor,J.E., Ben Yehuda,S., Losick,R., and Kolter,R. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 11621-11626.
- Bravo,A., Illana,B., and Salas,M. (2000). Compartmentalization of phage ϕ 29 DNA replication: interaction between the primer terminal protein and the membrane-associated protein p1. *EMBO J.* 19, 5575-5584.
- Bravo,A. and Salas,M. (1997). Initiation of bacteriophage ϕ 29 DNA replication *in vivo*: assembly of a membrane-associated multiprotein complex. *J. Mol. Biol.* 269, 102-112.
- Breier,A.M. and Grossman,A.D. (2007). Whole-genome analysis of the chromosome partitioning and sporulation protein Spo0J (ParB) reveals spreading and origin-distal sites on the *Bacillus subtilis* chromosome. *Molecular Microbiology* 64, 703-718.

- Browning,D.F. and Busby,S.J.W. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature Rev. Microbiol.* 2, 57-65.
- Bullock,W.O., Fernandez,J.M., and Short,J.M. (1987). XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with Beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-379.
- Burbulys,D., Trach,K.A., and Hoch,J.A. (1991). Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* 64, 545-552.
- Burkholder,W.F., Kurtser,I., and Grossman,A.D. (2001). Replication initiation proteins regulate a developmental checkpoint in *Bacillus subtilis*. *Cell* 104, 269-279.
- Busby,S. and Ebright,R.H. (1999). Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* 293, 199-213.
- Bylund,J.E., Haines,M.A., Piggot,P.J., and Higgins,M.L. (1993). Axial filament formation in *Bacillus subtilis*: induction of nucleoids of increasing length after addition of chloramphenicol to exponential-phase cultures approaching stationary phase. *J. Bacteriol.* 175, 1886-1890.
- Calendar,R. (2006). The bacteriophages., R.Calendar, ed. (New York: Plenum Press), pp. 1-592.
- Calles,B., Salas,M., and Rojo,F. (2002). The ϕ 29 transcriptional regulator contacts the nucleoid protein p6 to organize a repression complex. *EMBO J.* 21, 6185-6194.
- Camacho,A. and Salas,M. (2001a). Mechanism for the switch of ϕ 29 DNA early to late transcription by regulatory protein p4 and histone-like protein p6. *EMBO J.* 20, 6060-6070.
- Camacho,A. and Salas,M. (2004). Molecular interplay between RNA polymerase and two transcriptional regulators in promoter switch. *J. Mol. Biol.* 336, 357-368.
- Camacho,A. and Salas,M. (2001b). Repression of Bacteriophage phi 29 Early Promoter C2 by Viral Protein p6 Is Due to Impairment of Closed Complex. *J. Biol. Chem.* 276, 28927-28932.
- Cervin,M.A., Spiegelman,G.B., Raether,B., Ohlsen,K., Perego,M., and Hoch,J.A. (1998). A negative regulator linking chromosome segregation to developmental transcription in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 29, 85-95.
- Cha,J.H. and Stewart,G.C. (1997). The divIVA minicell locus of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 179, 1671-1683.
- Chai,Y., Chu,F., Kolter,R., and Losick,R. (2007). Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 0, ???
- Chen,G., Kumar,A., Wyman,T.H., and Moran,C.P.Jr. (2006). Spo0A-dependent activation of an extended -10 region promoter in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 188, 1411-1418.
- Chung,J.D., Stephanopoulos,G., Ireton,K., and Grossman,A.D. (1994). Gene expression in single cells of *Bacillus subtilis*: evidence that a threshold mechanism controls the initiation of sporulation. *J. Bacteriol.* 176, 1977-1984.
- Claverys,J.P., Prudhomme,M., and Martin,B. (2006). Induction of Competence Regulons as a General Response to Stress in Gram-Positive Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 60, 451-475.

- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49, 711-745.
- Crucitti, P., Abril, A.M., and Salas, M. (2003). Bacteriophage Phi 29 Early Protein p17. SELF-ASSOCIATION AND HETERO-ASSOCIATION WITH THE VIRAL HISTONE-LIKE PROTEIN p6. *J. Biol. Chem.* 278, 4906-4911.
- Daniel, R.A., Williams, A.M., and Errington, J. (1996). A complex four-gene operon containing essential cell division gene *pbpB* in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 178, 2343-2350.
- de Boer, P., Crossley, R., and Rothfield, L. (1992). The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature* 359, 254-256.
- de Boer, P., Crossley, R., Hand, A.R., and Rothfield, L. (1991). The MinD protein is a membrane ATPase required for the correct placement of the Escherichia coli division site. *EMBO J.* 10, 4371-4380.
- Dixit, M., Murudkar, C.S., and Rao, K.K. (2002). *epr* Is Transcribed from a σ^D Promoter and Is Involved in Swarming of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184, 596-599.
- Draper, G.C. and Gober, J.W. (2002). Bacterial chromosome segregation. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 567-597.
- Duggin, I.G., Andersen, P.A., Smith, M.T., Wilce, J.A., King, G.F., and Wake, R.G. (1999). Site-directed mutants of RTP of *Bacillus subtilis* and the mechanism of replication fork arrest. *Journal of Molecular Biology* 286, 1325-1335.
- Dworkin, J. and Losick, R. (2005). Developmental commitment in a bacterium. *Cell* 121, 401-409.
- Edwards, D.H. and Errington, J. (1997). The *Bacillus subtilis* DivIVA protein targets to the division septum and controls the site specificity of cell division. *Mol. Microbiol.* 24, 905-915.
- Elías-Arnanz, M. and Salas, M. (1999). Functional interactions between a phage histone-like protein and a transcriptional factor in regulation of $\phi 29$ early-late transcriptional switch. *Genes Dev.* 13, 2502-2513.
- Errington, J. (2001). Septation and chromosome segregation during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 660-666.
- Fawcett, P., Eichenberger, P., Losick, R., and Youngman, P. (2000). The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8063-8068.
- Ferrell, J.E. (2002). Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability. *Current Opinion in Cell Biology* 14, 140-148.
- Frappier, L., Goldsmith, K., and Bendell, L. (1994). Stabilization of the EBNA 1 protein on the Epstein Barr virus latent origin of DNA replication by a DNA looping mechanism. *J. Biol. Chem.* 269, 1057-1062.
- Frappier, L. and O'Donnell, M. (1991). Epstein-Barr nuclear antigen 1 mediates a DNA loop within the latent replication origin of Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10875-10879.

- Freire,R., Salas,M., and Hermoso,J.M. (1994). A new protein domain for binding to DNA through the minor groove. *EMBO J.* *13*, 4353-4360.
- Freire,R., Serrano,M., Salas,M., and Hermoso,J.M. (1996). Activation of replication origins in ϕ 29-related phages requires the recognition of initiation proteins to specific nucleoprotein complexes. *J. Biol. Chem.* *271*, 31000-31007.
- Fujita,M., González-Pastor,J.E., and Losick,R. (2005). High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *187*, 1357-1368.
- Fujita,M. and Losick,R. (2005). Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes Dev.* *19*, 2236-2244.
- Fukuoka,T., Moriya,S., Yoshikawa,H., and Ogasawara,N. (1990). Purification and characterization of an initiation protein for chromosomal replication, DnaA, in *Bacillus subtilis*. *J. Biochem. (Tokyo)* *107*, 732-739.
- Fuller,R.S., Funnell,B.E., and Kornberg,A. (1984). The dnaA protein complex with the E. coli chromosomal replication origin (oriC) and other DNA sites. *Cell* *38*, 889-900.
- Fung,E., Bouet,J.-Y., and Funnell,B.E. (2001). Probing the ATP-binding site of P1 ParA: partition and repression have different requirements for ATP binding and hydrolysis. *EMBO J.* *20*, 4901-4911.
- Galas,D.J. and Schmitz,A. (1978). DNAase footprinting a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucl. Acids Res.* *5*, 3157-3170.
- Garvey,K.J., Saedi,M.S., and Ito,J. (1986). Nucleotide sequence of *Bacillus* phage Φ 29 genes 14 and 15: homology of gene 15 with other phage lysozymes. *Nucleic Acids Res.* *14*, 10001-10008.
- Gascón,I., Lázaro,J.M., and Salas,M. (2000). Differential functional behavior of viral ϕ 29, Nf, and GA-1 SSB proteins. *Nucleic Acids Res.* *28*, 2034-2042.
- Glaser,P., Sharpe,M.E., Raether,B., Perego,M., Ohlsen,K., and Errington,J. (1997). Dynamic, mitotic-like behavior of a bacterial protein required for accurate chromosome partitioning. *Genes Dev.* *11*, 1160-1168.
- González-Huici,V., Salas,M., and Hermoso,J.M. (2004). The push-pull mechanism of bacteriophage ϕ 29 DNA injection. *Mol. Microbiol.* *52*, 529-540.
- Gonzalez-Huici,V., Alcorlo,M., Salas,M., and Hermoso,J.M. (2004). Binding of phage {Phi}29 architectural protein p6 to the viral genome: evidence for topological restriction of the phage linear DNA. *Nucl. Acids Res.* *32*, 3493-3502.
- González-Huici,V., Salas,M., and Hermoso,J.M. (2006). Requirements for *Bacillus subtilis* bacteriophage [Phi]29 DNA ejection. *Gene* *374*, 19-25.
- González-Huici,V., Salas,M., and Hermoso,J.M. (2006). Requirements for *Bacillus subtilis* bacteriophage [Phi]29 DNA ejection. *Gene* *374*, 19-25.
- González-Pastor,J.E., Hobbs,E.C., and Losick,R. (2003). Cannibalism by Sporulating Bacteria. *Science* *301*, 510-513.

- Gordon,G.S., Sitnikov,D., Webb,C.D., Teleman,A., Straight,A., Losick,R., Murray,A.W., and Wright,A. (1997). Chromosome and low copy plasmid segregation in *E.coli*: visual evidence for distinct mechanisms. *Cell* 90, 1113-1121.
- Gourse,R.L., Ross,W., and Gaal,T. (2000). UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol. Microbiol.* 37, 687-695.
- Graumann,P.L. (2006). Different genetic programmes within identical bacteria under identical conditions: the phenomenon of bistability greatly modifies our view on bacterial populations. *Molecular Microbiology* 61, 560-563.
- Grimsley,J.K., Tjalkens,R.B., Strauch,M.A., Bird,T.H., Spiegelman,G.B., Hostomsky,Z., Whiteley,J.M., and Hoch,J.A. (1994). Subunit composition and domain structure of the Spo0A sporulation transcription factor of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 269, 16977-16982.
- Grossman,A.D. (1995a). Genetic Networks Controlling the Initiation of Sporulation and the Development of Genetic Competence in *Bacillus Subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* 29, 477-508.
- Grossman,A.D. (1995b). Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* 29, 477-508.
- Grossman,A.D. and Losick,R. (1988). Extracellular Control of Spore Formation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85, 4369-4373.
- Guo,P. (2002). Structure and function of [phi]29 hexameric RNA that drives the viral DNA packaging motor: Review. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Academic Press), pp. 415-442.
- Gutiérrez,C., Sogo,J.M., and Salas,M. (1991). Analysis of replicative intermediates produced during bacteriophage ϕ 29 DNA replication *in vitro*. *J. Mol. Biol.* 222, 983-994.
- Hamoen,L.W., Venema,G., and Kuipers,O.P. (2003). Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology* 149, 9-17.
- Hamon,M.A. and Lazazzera,B.A. (2001). The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 42, 1199-1209.
- Hamon,M.A., Stanley,N.R., Britton,R.A., Grossman,A.D., and Lazazzera,B.A. (2004). Identification of AbrB-regulated genes involved in biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 52, 847-860.
- Hasty,J., Pradines,J., Dolnik,M., and Collins,J.J. (2000). Noise-based switches and amplifiers for gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 2075-2080.
- Henriques,A.O. and Moran,C.P. (2000). Structure and Assembly of the Bacterial Endospore Coat. *Methods* 20, 95-110.
- Hermoso,J.M., Méndez,E., Soriano,F., and Salas,M. (1985). Location of the serine residue involved in the linkage between the terminal protein and the DNA of ϕ 29. *Nucleic Acids Res.* 13, 7715-7728.
- Hilbert,D.W. and Piggot,P.J. (2004). Compartmentalization of Gene Expression during *Bacillus subtilis* Spore Formation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 234-262.

- Hoch, J.A. (1993). Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 441-465.
- Hwang, D.S. and Kornberg, A. (1992). Opening of the replication origin of *Escherichia coli* by DnaA protein with protein HU or IHF. *J. Biol. Chem.* 267, 23083-23086.
- Imai, Y., Ogasawara, N., Ishigo-oka, D., Kadoya, R., Daito, T., and Moriya, S. (2000). Subcellular localization of Dna-initiation proteins of *Bacillus subtilis*: evidence that chromosome replication begins at either edge of the nucleoids. *Molecular Microbiology* 36, 1037-1048.
- Inciarte, M.R., Salas, M., and Sogo, J.M. (1980). The structure of replicating DNA molecules of *Bacillus subtilis* phage $\phi 29$. *J. Virol.* 34, 187-190.
- Ireton, K. and Grossman, A.D. (1994). A developmental checkpoint couples the initiation of sporulation to DNA replication in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* 13, 1566-1573.
- Ireton, K., Gunther, N.W., and Grossman, A.D. (1994). *spo0J* is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176, 5320-5329.
- Ireton, K., Rudner, D.Z., Siranosian, K.J., and Grossman, A.D. (1993). Integration of multiple developmental signals in *Bacillus subtilis* through the Spo0A transcription factor. *Genes Dev.* 7, 283-294.
- Isaacs, F.J., Hasty, J., Cantor, C.R., and Collins, J.J. (2003). Prediction and measurement of an autoregulatory genetic module. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 7714-7719.
- Ishigo-oka, D., Ogasawara, N., and Moriya, S. (2001). DnaD Protein of *Bacillus subtilis* Interacts with DnaA, the Initiator Protein of Replication. *J. Bacteriol.* 183, 2148-2150.
- Ishikawa, S., Core, L., and Perego, M. (2002). Biochemical Characterization of Aspartyl Phosphate Phosphatase Interaction with a Phosphorylated Response Regulator and Its Inhibition by a Pentapeptide. *J. Biol. Chem.* 277, 20483-20489.
- Ito, J., Meinke, W., Hathaway, G., and Spizizen, J. (1973). Studies on *Bacillus subtilis* bacteriophage $\phi 15$. *Virology* 56, 110-122.
- Ito, J. and Spizizen, J. (1972). Early-blocked asporogenous mutants of *Bacillus subtilis*. In *Spores V*, H.O. Halvorson, R. Hanson, and L.L. Campbell, eds. (Washington, D.C.: American Society for Microbiology), pp. 107-112.
- Jensen, R.B. and Shapiro, L. (1999). Chromosome segregation during the prokaryotic cell division cycle. *Current Opinion in Cell Biology* 11, 726-731.
- Jeon, Y.H., Yamazaki, T., Otomo, T., Ishihama, A., and Kyogoku, Y. (1997). Flexible linker in the RNA polymerase alpha subunit facilitates the independent motion of the C-terminal activator contact domain. *J. Mol. Biol.* 267, 953-962.
- Jiang, M., Shao, W., Perego, M., and Hoch, J.A. (2000). Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 38, 535-542.
- Karoui, M.E. and Errington, J. (2001). Isolation and characterization of topological specificity mutants of minD in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 42, 1211-1221.

- Kawamura,F. and Ito,J. (1974). Bacteriophage gene expression in sporulating cells of *Bacillus subtilis* 168. *Virology* 62, 414-425.
- Kearns,D.B., Chu,F., Branda,S.S., Kolter,R., and Losick,R. (2005). A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 55, 739-749.
- Kearns,D.B. and Losick,R. (2003). Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 49, 581-590.
- Kelman,Z. and O'Donnell,M. (1995). DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 171-200.
- Kline,B.C., Kogoma,T., Tam,J.E., and Shields,M.S. (1986). Requirement of the *Escherichia coli dnaA* gene product for plasmid F maintenance. *J. Bacteriol.* 168, 440-443.
- Kornberg,A. and Baker,T.A. (1992). DNA replication., A.Kornberg and T.A.Baker, eds. (New York: W. H. Freeman and Co.).
- Krause,M., Rückert,B., Lurz,R., and Messer,W. (1997). Complexes at the replication origin of *Bacillus subtilis* with homologous and heterologous DnaA protein. *J. Mol. Biol.* 274, 365-380.
- Kunst,F., Ogasawara,M., Moszer,I., Alberini,A.M., Alloni,G., Azevedo,V., Bertero,M.G., Bessières,P., Bolotin,A., Borchert,S., Boriss,R., Boursier,L., Brans,A., Braun,M., Brignell,S.C., Bron,S., Brouillet,S., Bruschi,C.V., Caldwell,B., Capuano,V., Carter,N.M., Choi,S.-K., Codani,J.-J., Connerton,F., Cummings,N.J., Danierl,R.A., Denizot,F., Devine,K.M., Düsterhöft,A., Ehrlich,S.D., Emmerson,P.T., Entia,K.D., Errington,J., Fabret,C., Ferrari,E., Foulger,D., Fritz,C., Fyjita,M., Fujita,Y., Fuma,S., Galizzi,A., Galleron,N., Ghim,S.-Y., Glaser,P., Foffeau,A., Golightly,E.J., Grandi,G., Guiseppie,G., Guy,B.J., Haga,K., Haiech,J., Harwood,C.R., Hénaut,A., Hilbert,H., Holsappel,S., Hosono,S., Hullo,M.-F., Itaya,M., Jones,L., Joris,B., Karamata,D., Kasahar,Y., Klaerr-Blanchard,M., Klein,C., Kobayashi,Y., Koetter,P., Koningstein,G., Krogh,S., Kumano,M., Kurita,K., Lapidus,A., Lardinois,S., Lauber,J., Lazarevic,V., Lee,S.-M., Levine,A., Liu,H., Masuda,S., Mauël,C., Médigue,C., Medina,N., Mellado,R.P., Mizuno,M., Moestl,D., Nakai,S., Noback,M., Noone,D., O'Reilly,M., Ogawa,K., Ogiwara,A., Oudega,B., Park,S.-H., Parro,V., Hohl,T.M., Portetelle,D., Porwollik,S., Prescott,A.M., Presecan,E., Pujic,P., Purnelle,B., Rapoport,G., Rey,M., Reynolds,S., Rieger,M., Rivolta,C., Rocha,E., Roche,B., Rose,M., Sadaie,Y., Sato,T., Scanian,E., Schleich,S., Schroeter,R., Scoffone,F., Sekiguchi,J., Sekowska,A., Seror,S.J., Serror,P., Shin,B.-S., Soldo,B., Sorokin,A., Tacconi,E., Takagi,T., Takahashi,H., Takemaru,K., Takeuchi,M., Tamakoshi,A., Tanaka,T., Terpstra,P., Tognoni,A., Tosato,V., Uchiyama,S., Vandenbol,M., Vannier,F., Vassarotti,A., Viari,A., Wambutt,R., Wedler,E., Wedler,H., Weitzenegger,T., Winters,P., Wipat,A., Yamamoto,H., Yamane,K., Yasumoto,K., Yata,K., Yoshida,K., Yoshikawa,H.-F., Zumstein,E., Yoshikawa,H., and Danchin,A. (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390, 249-256.
- Ladds,J.C., Muchová,K., Blaškovic,D., Lewis,R.J., Brannigan,J.A., Wilkinson,A.J., and Barák,I. (2003). The response regulator Spo0A from *Bacillus subtilis* is efficiently phosphorylated in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 223, 153-157.
- Leavitt,M.C. and Ito,J. (1987). Nucleotide sequence of *Bacillus* phage Nf terminal protein gene. *Nucl. Acids Res.* 15, 5251-5259.

- LeDeaux,J.R. and Grossman,A.D. (1995). Isolation and characterization of kinC, a gene that encodes a sensor kinase homologous to the sporulation sensor kinases KinA and KinB in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *177*, 166-175.
- Levin,P.A. and Losick,R. (1996). Transcription factor SpoOA switches the localization of the cell division protein FtsZ from a medial to a bipolar pattern in *Bacillus subtilis*. *Genes Develop* *10*, 478-488.
- Levin,P.A., Margolis,P.S., Setlow,P., Losick,R., and Sun,D. (1992). Identification of *Bacillus subtilis* genes for septum placement and shape determination. *J. Bacteriol.* *174*, 6717-6728.
- Levin,P.A., Shim,J.J., and Grossman,A.D. (1998). Effect of minCD on FtsZ Ring Position and Polar Septation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *180*, 6048-6051.
- Lewis,P.J. and Errington,J. (1997). Direct evidence for active segregation of oriC regions of the *Bacillus subtilis* chromosome and co-localization with the SpoOJ partitioning protein. *Mol. Microbiol.* *25*, 945-954.
- Lewis,R.J., Brannigan,J.A., Muchová,K., Barák,I., and Wilkinson,A.J. (1999). Phosphorylated aspartate in the structure of a response regulator protein. *J. Mol. Biol.* *294*, 9-15.
- Lewis,R.J., Krzywda,S., Brannigan,J.A., Turkenburg,J.P., Muchová,K., Dodson,E.J., Barák,I., and Wilkinson,A.J. (2000). The *trans*-activation domain of the sporulation response regulator Spo0A revealed by X-ray crystallography. *Mol. Microbiol.* *38*, 198-212.
- Lewis,R.J., Scott,D.J., Brannigan,J.A., Ladds,J.C., Cervin,M.A., Spiegelman,G.B., Hogget,J.G., Barák,I., and Wilkinson,A.J. (2002). Dimer formation and transcription activation in the sporulation response regulator Spo0A. *J. Mol. Biol.* *316*, 235-245.
- Lin,D.C.H. and Grossman,A.D. (1998). Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site. *Cell* *92*, 675-685.
- Lin,D.C.H., Levin,P.A., and Grossman,A.D. (1997). Bipolar localization of a chromosome partition protein in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *94*, 4721-4726.
- Liu,J., Tan,K., and Stormo,G.D. (2003). Computational identification of the Spo0A-phosphate regulon that is essential for the cellular differentiation and development in Gram-positive spore-forming bacteria. *Nucleic Acids Res.* *31*, 6891-6903.
- Marston,A.L. and Errington,J. (1999). Dynamic movement of the ParA-like Soj protein of *B. subtilis* and its dual role in nucleoid organization and developmental regulation. *Mol. Cell* *3*, 673-682.
- Marston,A.L., Thomaidis,H.B., Edwards,D.H., Sharpe,M.E., and Errington,J. (1998). Polar localization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the mid-cell division site. *Genes Dev.* *12*, 3419-3430.
- Martín,G., Lázaro,J.M., Méndez,E., and Salas,M. (1989). Characterization of the phage ϕ 29 protein p5 as a single-stranded DNA binding protein. Function in ϕ 29 DNA-protein p3 replication. *Nucleic Acids Res.* *17*, 3663-3672.
- Meijer, W. J. J. Replication and maintenance of plasmids in *Bacillus subtilis*. 1995.
Ref Type: Thesis/Dissertation

- Meijer, W.J.J., Castilla-Llorente, V., Villar, L., Murray, H., Errington, J., and Salas, M. (2005). Molecular basis for the exploitation of spore formation as survival mechanism by virulent phage ϕ 29. *EMBO J.* *24*, 3647-3657.
- Meijer, W.J.J., de Boer, A., van Tongeren, S., Venema, G., and Bron, S. (1995). Characterization of the replication region of the *Bacillus subtilis* plasmid pLS20: a novel type of replicon. *Nucleic Acids Res.* *23*, 3214-3223.
- Meijer, W.J.J., Horcajadas, J.A., and Salas, M. (2001a). ϕ 29-family of phages. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *65*, 261-287.
- Meijer, W.J.J., Lewis, P.J., Errington, J., and Salas, M. (2000). Dynamic relocalization of phage ϕ 29 DNA during replication and the role of the viral protein p16.7. *EMBO J.* *19*, 4182-4190.
- Meijer, W.J.J. and Salas, M. (2004). Relevance of UP elements for three strong *Bacillus subtilis* phage ϕ 29 promoters. *Nucleic Acids Res.* *32*, 1166-1176.
- Meijer, W.J.J., Serna-Rico, A., and Salas, M. (2001b). Characterization of the bacteriophage ϕ 29-encoded protein p16.7: a membrane protein involved in phage DNA replication. *Mol. Microbiol.* *39*, 731-746.
- Mellado, R.P., Barthelemy, I., and Salas, M. (1986a). *In vitro* transcription of bacteriophage ϕ 29 DNA. Correlation between *in vitro* and *in vivo* promoters. *Nucleic Acids Res.* *14*, 4731-4741.
- Mellado, R.P., Barthelemy, I., and Salas, M. (1986b). *In vivo* transcription of bacteriophage ϕ 29 DNA early and late promoter sequences. *J. Mol. Biol.* *191*, 191-197.
- Mellado, R.P., Peñalva, M.A., Inciarte, M.R., and Salas, M. (1980). The protein covalently linked to the 5' termini of the DNA of *Bacillus subtilis* phage ϕ 29 is involved in the initiation of DNA replication. *Virology* *104*, 96.
- Mencía, M., Monsalve, M., Rojo, F., and Salas, M. (1996). Transcription activation by phage ϕ 29 protein p4 is mediated by interaction with the α subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *93*, 6616-6620.
- Mencía, M., Salas, M., and Rojo, F. (1993). Residues of the *Bacillus subtilis* phage ϕ 29 transcriptional activator required both to interact with RNA polymerase and to activate transcription. *J. Mol. Biol.* *233*, 695-704.
- Méndez, J., Blanco, L., Esteban, J.A., Bernad, A., and Salas, M. (1992). Initiation of ϕ 29 DNA replication occurs at the second 3' nucleotide of the linear template: A sliding-back mechanism for protein-primed DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *89*, 9579-9583.
- Méndez, J., Blanco, L., and Salas, M. (1997). Protein-primed DNA replication: a transition between two modes of priming by a unique DNA polymerase. *EMBO J.* *16*, 2519-2527.
- Messer, W. (2002). The bacterial replication initiator DnaA. DnaA and *oriC*, the bacterial mode to initiate DNA replication. *FEMS Microbiol. Rev.* *26*, 355-374.
- Miron, A., Mukherjee, S., and Bastia, D. (1992). Activation of distant replication origins *in vivo* by DNA looping as revealed by a novel mutant form of an initiator protein defective in cooperativity at a distance. *EMBO J.* *11*, 1205-1216.

- Mizukami,Y., Sekiya,T., and Hirokawa,H. (1986). The nucleotide sequences of the heterologous region between the genomes of Bacillus phages M2 and Nf that indicate the two phages are originally identical. *FEBS Letters* 197, 311-314.
- Mohl,D.A. and Gober,J.W. (1997). Cell cycle-dependent polar localization of chromosome partitioning proteins in *Caulobacter crescentus*. *Cell* 88, 675-684.
- Molle,V., Fujita,M., Jensen,S.T., Eichenberger,P., González-Pastor,J.E., Liu,J.S., and Losick,R. (2003). The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 50, 1683-1701.
- Monsalve,M., Calles,B., Mencía,M., Salas,M., and Rojo,F. (1997). Transcription activation or repression by phage ϕ 29 protein p4 depends on the strength of the RNA polymerase-promoter interactions. *Mol. Cell* 1, 99-107.
- Monsalve,M., Mencía,M., Rojo,F., and Salas,M. (1995). Transcription regulation in *Bacillus subtilis* phage ϕ 29: Expression of the viral promoters throughout the infection cycle. *Virology* 207, 23-31.
- Monsalve,M., Mencía,M., Rojo,F., and Salas,M. (1996a). Activation and repression of transcription at two different phage ϕ 29 promoters are mediated by interaction of the same residues of regulatory protein p4 with RNA polymerase. *EMBO J.* 15, 383-391.
- Monsalve,M., Mencía,M., Salas,M., and Rojo,F. (1996b). Protein p4 represses phage ϕ 29 A2c promoter by interacting with the α subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8913-8918.
- Moran,C.P.Jr., Lang,N., LeGrice,S.F.J., Lee,G., Stephans,M., Sonenshein,A.L., Pero,J., and Losick,R. (1982). Nucleotide sequence that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 186, 339-346.
- Moreno,F. (1979). On the trapping of phage genomes in spores of *Bacillus subtilis* 168. Reciprocal exclusion of phages ϕ 29 and ϕ e during outgrowth of spores. *Virology* 93, 357-368.
- Moreno,F., Camacho,A., Viñuela,E., and Salas,M. (1974). Suppressor-sensitive mutants and genetic map of *Bacillus subtilis* bacteriophage ϕ 29. *Virology* 62, 1-16.
- Moriya,S., Atlung,T., Hansen,F.G., Yoshikawa,H., and Ogasawara,N. (1992). Cloning of an autonomously replicating sequence (ars) from the *Bacillus subtilis* chromosome. *Mol. Microbiol.* 6, 309-315.
- Moriya,S., Fukuoka,T., Ogasawara,N., and Yoshikawa,H. (1988). Regulation of initiation of the chromosomal replication by DnaA-boxes in the origin region of the *Bacillus subtilis* chromosome. *EMBO J.* 7, 2911-2917.
- Moriya,S., Imai,Y., Hassan,A.K.M., and Ogasawara,N. (1999). Regulation of initiation of *Bacillus subtilis* chromosome replication. *Plasmid* 41, 17-29.
- Moriya,S., Kato,K., Yoshikawa,H., and Ogasawara,N. (1990). Isolation of a *dnaA* mutant of *Bacillus subtilis* defective in initiation of replication: amount of DnaA protein determines cells' initiation potential. *EMBO J.* 9, 2905-2910.
- Muchová,K., Lewis,R.J., Perecko,D., Brannigan,J.A., Ladds,J.C., Leech,A., Wilkinson,A.J., and Barák,I. (2004). Dimer-induced signal propagation in Spo0A. *Mol. Microbiol.* 53, 829-842.

- Mukherjee,A., Dai,K., and Lutkenhaus,J. (1993). Escherichia coli Cell Division Protein FtsZ is a Guanine Nucleotide Binding Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *90*, 1053-1057.
- Murray,H., Ferreira,H., and Errington,J. (2006). The bacterial chromosome segregation protein Spo0J spreads along DNA from parS nucleation sites. *Molecular Microbiology* *61*, 1352-1361.
- Murthy,V., Meijer,W.J.J., Blanco,L., and Salas,M. (1998). DNA polymerase template switching at specific sites on the ϕ 29 genome causes the *in vivo* accumulation of subgenomic ϕ 29 DNA molecules. *Mol. Microbiol.* *29*, 787-798.
- Nicholson,W.L. and Setlow,P. (1990). Sporulation, germination and outgrowth. In *Molecular biological methods for Bacillus*, C.R.Harwood and S.M.Cutting, eds. (Chichester, UK: John Wiley and Sons), pp. 391-450.
- Nicholson,W.L., Munakata,N., Horneck,G., Melosh,H.J., and Setlow,P. (2000). Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *64*, 548-572.
- Niki,H. and Hiraga,S. (1997). Subcellular distribution of actively partitioning F plasmid during the cell division cycle in *E. coli*. *Cell* *90*, 951-957.
- Niki,H., Yamaichi,Y., and Hiraga,S. (2000). Dynamic organization of chromosomal DNA in Escherichia coli. *Genes Dev.* *14*, 212-223.
- Nuez,B., Rojo,F., and Salas,M. (1992). Phage ϕ 29 regulatory protein p4 stabilizes the binding of the RNA polymerase to the late promoter in a process involving direct protein-protein contacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *89*, 11401-11405.
- Nuez,B., Rojo,F., and Salas,M. (1994). Requirement for an A-tract structure at the binding site of phage ϕ 29 transcriptional activator. *J. Mol. Biol.* *237*, 175-181.
- Nuez,B. and Salas,M. (1993). Bacteriophage Nf DNA region controlling late transcription: structural and functional homology with bacteriophage ϕ 29. *Nucleic Acids Res.* *21*, 2861-2865.
- Ogasawara N,M.S.v.M.K.H.F.Y.H. (1985). Conservation of genes and their organization in the chromosomal replication origin region of Bacillus subtilis and Escherichia coli. *EMBO J.* *1985 Dec 1;4*, 3345-3350.
- Ogasawara,N. and Yoshikawa,H. (1992). Genes and their organization in the replication origin region of the bacterial chromosome. *Mol. Microbiol.* *6*, 629-634.
- Ogura,T. and Hiraga,S. (1983). Mini-F Plasmid Genes That Couple Host Cell Division to Plasmid Proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *80*, 4784-4788.
- Ohlsen,K.L., Grimsley,J.K., and Hoch,J.A. (1994). Deactivation of the sporulation transcription factor SpoOA by the SpoOE protein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *91*, 1756-1760.
- Paces,V., Vlcek,C., and Urbanek,P. (1986). Nucleotide sequence of the late region of *Bacillus subtilis* phage PZA, a close relative of Φ 29. *Gene* *44*, 107-114.
- Parker,G.F., Daniel,R.A., and Errington,J. (1996). Timing and genetic regulation of commitment to sporulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* *142*, 3445-3452.

- Partridge,S.R. and Errington,J. (1993). The importance of morphological events and intercellular interactions in the regulation of prespore-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 8, 945-955.
- Pastrana,R., Lázaro,J.M., Blanco,L., García,J.A., Méndez,E., and Salas,M. (1985). Overproduction and purification of protein p6 of *Bacillus subtilis* phage ϕ 29: role in the initiation of DNA replication. *Nucleic Acids Res.* 13, 3083-3100.
- Pecenkova,T. and Paces,V. (1999). Molecular phylogeny of Φ 29-like phages and their evolutionary relatedness to other protein-primed replicating phages and other phages hosted by Gram-positive bacteria. *J. Mol. Evol.* 48, 197-208.
- Perego,M., Cole,S.P., Burbulys,D., Trach,K., and Hoch,J.A. (1989). Characterization of the gene for a protein kinase which phosphorylates the sporulation-regulatory proteins Spo0A and Spo0F of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 171, 6187-6196.
- Perego,M. and Hoch,J.A. (2002). Two-component systems, phosphorelays, and regulation of their activities by phosphatases. In *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells, A.L.Sonenshein, J.A.Hoch, and R.Losick, eds. (Washington, DC: American society for microbiology press), pp. 473-481.
- Perego,M., Spiegelman,G.B., and Hoch,J.A. (1988). Structure of the gene for the transition state regulator, *abrB*: regulator synthesis is controlled by the *spo0A* sporulation gene in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 2, 689-699.
- Perego,M. (2001). A new family of aspartyl phosphate phosphatases targeting the sporulation transcription factor Spo0A of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 42, 133-143.
- Pérez-Lago,L., Salas,M., and Camacho,A. (2005a). A precise DNA bend angle is essential for the function of the phage ϕ 29 transcriptional regulator. *Nucl. Acids Res.* 33, 126-134.
- Pérez-Lago,L., Salas,M., and Camacho,A. (2005b). Homologies and Divergences in the Transcription Regulatory System of Two Related *Bacillus subtilis* Phages. *J. Bacteriol.* 187, 6403-6409.
- Perry,S.E. and Edwards,D.H. (2004). Identification of a polar targeting determinant for *Bacillus subtilis* DivIVA. *Molecular Microbiology* 54, 1237-1249.
- Piggot,P.J. and Coote,J.G. (1976). Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriol. Rev.* 1976 Dec , 908-962.
- Piggot,P.J. and Losick,R. (2002). Sporulation genes and intercompartmental regulation. In *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells, A.L.Sonenshein, J.A.Hoch, and R.Losick, eds. (Washington, DC: American society for Microbiology press), pp. 483-517.
- Piggot,P.J. and Hilbert,D.W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology* 7, 579-586.
- Pogliano,J., Sharp,M.D., and Pogliano,K. (2002). Partitioning of Chromosomal DNA during Establishment of Cellular Asymmetry in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184, 1743-1749.
- Prieto,I., Serrano,M., Lázaro,J.M., Salas,M., and Hermoso,J.M. (1988). Interaction of the bacteriophage ϕ 29 protein p6 with double-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 314-318.

- Quisel,J.D. and Grossman,A.D. (2000). Control of sporulation gene expression in *Bacillus subtilis* by the chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB). *J. Bacteriol.* *182*, 3446-3451.
- Quisel,J.D., Lin,D.C.-H., and Grossman,A.D. (1999). Control of Development by Altered Localization of a Transcription Factor in *B. subtilis*. *Molecular Cell* *4*, 665-672.
- Rao,C.V., Wolf,D.M., and Arkin,A.P. (2002). Control, exploitation and tolerance of intracellular noise. *Nature* *420*, 231-237.
- Raskin,D.M. and de Boer,P.A.J. (1997). The MinE Ring: An FtsZ-Independent Cell Structure Required for Selection of the Correct Division Site in *E. coli*. *Cell* *91*, 685-694.
- RayChaudhuri,D. and Park,J.T. (1992). *Escherichia coli* cell-division gene *ftsZ* encodes a novel GTP-binding protein. *Nature* *359*, 251-254.
- Real,G., Autret,S., Harry,E.J., Errington,J., and Henriques,A.O. (2005). Cell division protein DivIB influences the Spo0J/Soj system of chromosome segregation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* *55*, 349-367.
- Robert Koch and Ferdinand Cohn (1876). *Die Aetiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des Bacillus anthracis*. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* *277-310*.
- Robert Koch,F.C. (1937). The Etiology of Anthrax, Based on the Ontogeny of the Anthrax Bacillus. *Medical Classics* *787-720*.
- Robertson,J.B., Gocht,M., Marahiel,M.A., and Zuber,P. (1989). AbrB, a Regulator of Gene Expression in *Bacillus*, Interacts with the Transcription Initiation Regions of a Sporulation Gene and an Antibiotic Biosynthesis Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *86*, 8457-8461.
- Rojo,F., Mencía,M., Monsalve,M., and Salas,M. (1998). Transcription activation and repression by interaction of a regulator with the α subunit of RNA polymerase: the model of phage ϕ 29 protein p4. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* *60*, 29-46.
- Rojo,F., Nuez,B., Mencía,M., and Salas,M. (1993). The main early and late promoters of *Bacillus subtilis* phage ϕ 29 form unstable open complexes with σ^A -RNA polymerase that are stabilized by DNA supercoiling. *Nucleic Acids Res.* *21*, 935-940.
- Rojo,F. and Salas,M. (1991). A DNA curvature can substitute phage ϕ 29 regulatory protein p4 when acting as a transcriptional repressor. *EMBO J.* *10*, 3429-3438.
- Rojo,F. and Salas,M. (1995). Transcriptional regulators: protein-DNA complexes and regulatory mechanisms. In *Microbial gene techniques. Methods in molecular genetics*, K.S.Adolph, ed. Academic Press, Inc.), pp. 421-438.
- Roth A,M.W. (2007). The DNA binding domain of the initiator protein DnaA. *EMBO J.* *1995 May 1*, 2106-2111.
- Rowland,S.L., Burkholder,W.F., Cunningham,K.A., Maciejewski,M.W., Grossman,A.D., and King,G.F. (2004). Structure and Mechanism of Action of Sda, an Inhibitor of the Histidine Kinases that Regulate Initiation of Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Cell* *13*, 689-701.

- Salas,M. (1991). Protein-priming of DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 39-71.
- Salas,M. and Rojo,F. (1993). Replication and transcription of bacteriophage ϕ 29. In *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: Biochemistry, Physiology, and molecular genetics, A.L.Sonenshein, J.A.Hoch, and R.Losick, eds. (Washington D.C.: American Society for Microbiology), pp. 843-858.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Satola,S., Baldus,J.M., and Moran,C.P.Jr. (1992). Binding of Spo0A stimulates *spoIIG* promoter activity in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 174, 1448-1453.
- Schaeffer,P., Millet,I., and Aubert,J. (1965). Catabolite repression of bacterial sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 704-711.
- Seredick,S. and Spiegelman,G.B. (2001). Lessons and questions from the structure of the Spo0A activation domain. *Trends Microbiol.* 9, 148-150.
- Serna-Rico,A., Muñoz-Espín,D., Villar,L., Salas,M., and Meijer,W.J.J. (2003). The integral membrane protein p16.7 organizes *in vivo* ϕ 29 DNA replication through interaction with both the terminal protein and ssDNA. *EMBO J.* 22, 2297-2306.
- Serna-Rico,A., Salas,M., and Meijer,W.J.J. (2002). The *Bacillus subtilis* phage ϕ 29 protein p16.7, involved in ϕ 29 DNA replication, is a membrane-localized single-stranded DNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* 277, 6733-6742.
- Serrano,M., Gutiérrez,C., Freire,R., Bravo,A., Salas,M., and Hermoso,J.M. (1994). Phage ϕ 29 protein p6: a viral histone-like protein. *Biochimie* 76, 981-991.
- Serrano,M., Gutiérrez,J., Prieto,I., Hermoso,J.M., and Salas,M. (1989). Signals at the bacteriophage ϕ 29 DNA replication origins required for protein p6 binding and activity. *EMBO J.* 8, 1879-1885.
- Serrano,M., Salas,M., and Hermoso,J.M. (1990). A novel nucleoprotein complex at a replication origin. *Science* 248, 1012-1016.
- Serrano-Heras,G., Ruiz-Maso,J.A., del Solar,G., Espinosa,M., Bravo,A., and Salas,M. (2007). Protein p56 from the *Bacillus subtilis* phage ϕ 29 inhibits DNA-binding ability of uracil-DNA glycosylase. *Nucl. Acids Res.* 35, 5393-5401.
- Shapiro,J.A. (1998). THINKING ABOUT BACTERIAL POPULATIONS AS MULTICELLULAR ORGANISMS. *Annual Review of Microbiology* 52, 81-104.
- Sharpe,M.E. and Errington,J. (1996). The *Bacillus subtilis* *soj-spoOJ* locus is required for a centromere-like function involved in prespore chromosome partitioning. *Mol. Microbiol.* 21, 501-509.
- Sharpe,M.E. and Errington,J. (1998). A fixed distance for separation of newly replicated copies of *oriC* in *Bacillus subtilis*: implications for co-ordination of chromosome segregation and cell division. *Mol. Microbiol.* 28, 981-990.
- Short,J.M., Fernandez,J.M., Sorge,J.S., and Huse,W.D. (1988). λ ZAP: a bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res.* 16, 7583-7600.

- Sievers,J., Raether,B., Perego,M., and Errington,J. (2002). Characterization of the parB-Like *yyaA* Gene of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *184*, 1102-1111.
- Skarstad,K. and Boye,E. (1994). The initiator protein DnaA: evolution, properties and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* *1217*, 111-130.
- Soengas,M.S., Gutiérrez,C., and Salas,M. (1995). Helix-destabilizing activity of $\phi 29$ single-stranded DNA binding protein: effect on the elongation rate during strand displacement DNA replication. *J. Mol. Biol.* *253*, 517-529.
- Sogo,J.M., Inciarte,M.R., Corral,J., Viñuela,E., and Salas,M. (1979). RNA polymerase binding sites and transcription map of the DNA of *Bacillus subtilis* phage $\phi 29$. *J. Mol. Biol.* *127*, 411-436.
- Solomon,J.M., Lazazzera,B.A., and Grossman,A.D. (1996). Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Develop* *10*, 2014-2024.
- Sonenshein,A.L. (1970). Trapping of unreplicated phage DNA into spores of *Bacillus subtilis* and its stabilization against damage by ^{32}P decay. *Virology* *42*, 488-495.
- Sonenshein,A.L. (2006). Bacteriophages: how bacterial spores capture and protect phage DNA. *Curr. Biol.* *16*, R14-R16.
- Strauch,M.A. (1995). Delineation of AbrB-binding sites on the *Bacillus subtilis* *spo0H*, *kinB*, *ftsAZ*, and *pbpE* promoters and use of a derived homology to identify a previously unsuspected binding site in the *bsuB1* methylase promoter. *J. Bacteriol.* *177*, 6999-7002.
- Strauch,M.A., Trach,K.A., Day,J., and Hoch,J.A. (1992). Spo0A activates and represses its own synthesis by binding at its dual promoters. *Biochimie* *74*, 619-626.
- Strauch,M.A., Webb,V., Spiegelman,G.B., and Hoch,J.A. (1990). The Spo0A protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *87*, 1801-1805.
- Studier,F.W. and Moffat,B.A. (1986). Use of T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* *189*, 113-130.
- Su,W., Middleton,T., Sugden,B., and Echols,H. (1991). DNA looping between the origin of replication of Epstein-Barr virus and its enhancer site: stabilization of an origin complex with Epstein-Barr nuclear antigen 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *88*, 10870-10874.
- Sueoka,N. (1998). Cell membrane and chromosome replication in *Bacillus subtilis*. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* *59*, 35-53.
- Sullivan,S.M. and Maddock,J.R. (2000). Bacterial sporulation: Pole-to-pole protein oscillation. *Current Biology* *10*, R159-R161.
- Sun,L. and Fuchs,J.A. (1994). Regulation of the *Escherichia coli* *nrd* operon: role of DNA supercoiling. *J. Bacteriol.* *176*, 4617-4626.
- Sutherland,I.W., Hughes,K.A., Skillman,L.C., and Tait,K. (2004). The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiology Letters* *232*, 1-6.

- Szurmant,H. and Ordal,G.W. (2004). Diversity in Chemotaxis Mechanisms among the Bacteria and Archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 301-319.
- Tam,N.K.M., Uyen,N.Q., Hong,H.A., Duc,L.H., Hoa,T.T., Serra,C.R., Henriques,A.O., and Cutting,S.M. (2006). The Intestinal Life Cycle of *Bacillus subtilis* and Close Relatives. *J. Bacteriol.* 188, 2692-2700.
- Tedin,K., Resch,A., Steiner,M., and Bläsi,U. (1995). Dual translational start motif evolutionary conserved in the holin gene of *Bacillus subtilis* phage Φ 29. *Virology* 206, 479-484.
- Teleman,A.A., Graumann,P.L., Lin,D.C.-H., Grossman,A.D., and Losick,R. (1998). Chromosome arrangement within a bacterium. *Current Biology* 8, 1102-1109.
- Thomaides,H.B., Freeman,M., El Karoui,M., and Errington,J. (2001a). Division-site-selection protein DivIVA of *Bacillus subtilis* has a second distinct function in chromosome segregation during sporulation. *Genes Dev.* 15, 1662-1673.
- Thomaides,H.B., Freeman,M., Karoui,M.E., and Errington,J. (2001b). Division site selection protein DivIVA of *Bacillus subtilis* has a second distinct function in chromosome segregation during sporulation. *Genes Dev.* 15, 1662-1673.
- Trach,K.A., Burbulys,D., Strauch,M.A., Wu,J.-J., Dhillon,N., Jonas,R., Hanstein,C., Kallio,P., Perego,M., Bird,T.H., Spiegelman,G.B., Fogher,C., and Hoch,J.A. (1991). Control of the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* by a phosphorelay. *Res. Microbiol.* 142, 815-823.
- Trach,K.A. and Hoch,J.A. (1993). Multisensory activation of the phosphorelay initiating sporulation in *Bacillus subtilis*: identification and sequence of the protein kinase of the alternate pathway. *Mol. Microbiol.* 8, 69-79.
- Trach,K.A., Chapman,J.W., Piggot,P.J., and Hoch,J.A. (1985). Deduced Product of the Stage 0 Sporulation Gene *spo0F* Shares Homology with the *Spo0A*, *OmpR*, and *SfrA* Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82, 7260-7264.
- van Wely,K.H.M., Swaving,J., Freudl,R., and Driessen,A.J.M. (2001). Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 437-454.
- Varley,A.W. and Stewart,G.C. (1992). The *divIVB* region of the *Bacillus subtilis* chromosome encodes homologs of *Escherichia coli* septum placement (*minCD*) and cell shape (*mreBCD*) determinants. *J. Bacteriol.* 174, 6729-6742.
- Veening,J.W., Hamoen,L.W., and Kuipers,O.P. (2005). Phosphatases modulate the bistable sporulation gene expression pattern in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 56, 1481-1494.
- Veening,J.W., Kuipers,O.P., Brul,S., Hellingwerf,K.J., and Kort,R. (2006). Effects of Phosphorelay Perturbations on Architecture, Sporulation, and Spore Resistance in Biofilms of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 188, 3099-3109.
- Vlcek,C. and Paces,V. (1986). Nucleotide sequence of the late region of *Bacillus* phage Φ 29 completes the 19285-bp sequence of Φ 29. Comparison with the homologous sequence of phage PZA. *Gene* 46, 215-225.
- Webb,C.D., Teleman,A., Gordon,S., Straight,A., Belmont,A., Lin,D.C.H., Grossman,A.D., Wright,A., and Losick,R. (1997). Bipolar localization of the replication origin regions of chromosomes in vegetative and sporulating cells of *B.subtilis*. *Cell* 88, 667-674.

- Whitehall,S., Austin,S., and Dixon,R. (1992). DNA supercoiling response of the [sigma]54-dependent *Klebsiella pneumoniae* nifL promoter in vitro. *Journal of Molecular Biology* 225, 591-607.
- Whiteley,H.R., Ramey,W.D., Spiegelman,G.B., and Holder,R.D. (1986). Modulation of *in vivo* and *in vitro* transcription of bacteriophage Φ 29 early genes. *Virology* 155, 392-401.
- Whitten,A.E., Jacques,D.A., Hammouda,B., Hanley,T., King,G.F., Guss,J.M., Trehella,J., and Langley,D.B. (2007). The Structure of the KinA-Sda Complex Suggests an Allosteric Mechanism of Histidine Kinase Inhibition. *Journal of Molecular Biology* 368, 407-420.
- Wu,L.J. and Errington,J. (1994). *Bacillus subtilis* SpoIIIE protein required for DNA segregation during asymmetric cell division. *Science* 264, 572-575.
- Wu,L.J. and Errington,J. (2003). RacA and the Soj-Spo0J system combine to effect polar chromosome segregation in sporulating *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 49, 1463-1475.
- Wu,L.J., Lewis,P.J., Allmansberger,R., Hauser,P.M., and Errington,J. (1995). A conjugation-like mechanism for prespore chromosome partitioning during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 9, 1316-1326.
- Wu,L.J. and Errington,J. (2004). Coordination of Cell Division and Chromosome Segregation by a Nucleoid Occlusion Protein in *Bacillus subtilis*. *Cell* 117, 915-925.
- York,K., Kenney,T.J., Satola,S., Moran,C.P.Jr., Poth,H., and Youngman,P. (1992). Spo0A controls the σ^A -dependent activation of *Bacillus subtilis* sporulation-specific transcription unit *spoIIIE*. *J. Bacteriol.* 174, 2648-2658.
- Yoshikawa,H., Elder,J.H., and Ito,J. (1986). Comparative studies on the small *Bacillus* bacteriophages. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 33, 39-49.
- Yoshikawa,H., Garvey,K.J., and Ito,J. (1985). Nucleotide sequence analysis of DNA replication origins of the small bacteriophages: evolutionary relationships. *Gene* 37, 125-130.
- Yoshikawa,H. and Ito,J. (1982). Nucleotide sequence of the major early region of bacteriophage Φ 29. *Gene* 17, 323-335.
- Yoshikawa,H. and Ogasawara,N. (1991). Structure and function of DnaA and the DnaA-box in eubacteria: evolutionary relationships of bacterial replication origins. *Molecular Microbiology* 5, 2589-2597.
- Zhao,H., Msadek,T., Zapf,J., Madhusudan,A., Hoch,J.A., and Varughese,K.I. (2002). DNA complexed structure of the key transcription factor initiating development in sporulating bacteria. *Structure* 10, 1041-1050.